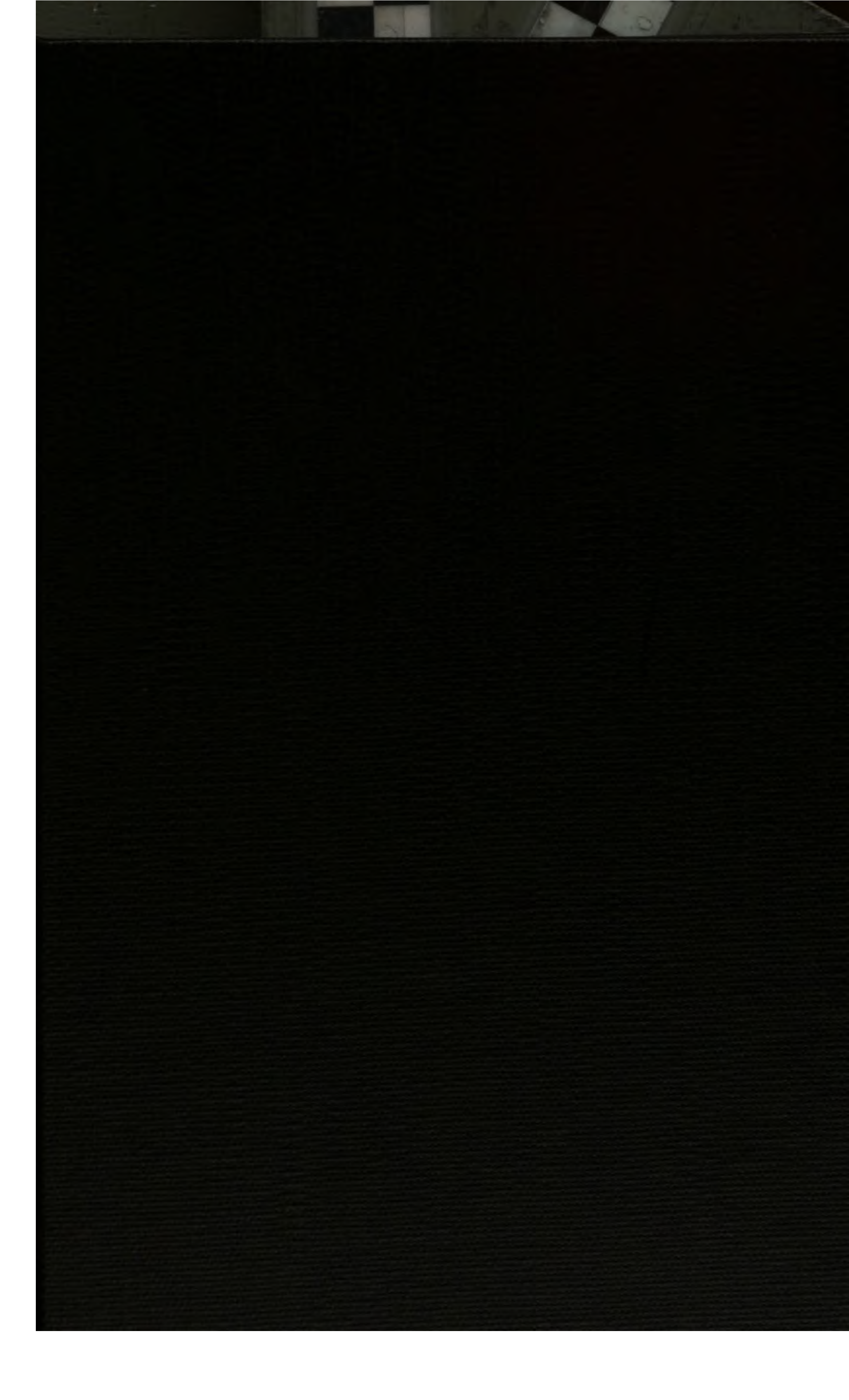






ARCHIVES INTERNATIONALES

DE

Pharmacodynamie et de Thérapie

PUBLIÉES PAR

E. GLEY, Paris et **J.-F. HEYMANS**, Gand

AVEC LA COLLABORATION DE

J.-J. Abel, Baltimore ; **M. Arthus**, Lausanne ; **A. Benedicenti**, Gênes ; **J.-C. Bock**, Copenhague ; **R. Bruynoghe**, Louvain ; **A. Bonanni**, Pavie ; **A.-J. Clarck**, Londres ; **M. Cloetta**, Zurich ; **P. Courmont**, Lyon ; **A.-R. Cushny**, Edimbourg ; **G. Coronedi**, Florence ; **H.-H. Dale**, Londres ; **W.-E. Dixon**, Cambridge ; **P. Giacoso**, Turin ; **J.-A. Gunn**, Oxford ; **F. Henríjean**, Liége ; **M. Henseval**, Gand ; **M. Ide**, Louvain ; **V. Jacques**, Bruxelles ; **A. Lumière**, Lyon ; **R. Luzzatto**, Modène ; **P. Marfori**, Naples ; **A. Mayor**, Genève ; **K. Morishima**, Kyoto ; **J. Novi**, Boulogne ; **G. Pouchet**, Paris ; **G. Poulsson**, Christiania ; **Ch. Richet**, Paris ; **G. Roux**, Paris ; **A. Richaud**, Paris ; **L. Sabbatini**, Padoue ; **G. Vinci**, Messine ; **A. Valenti**, Parme.

VOLUME XXVI, FASCICULE I-II

BRUXELLES
H. LAMERTIN, ÉDITEUR,
58, RUE COUDENBERG

PARIS
O. DOIN, ÉDITEUR
8, PLACE DE L'ODÉON

1921

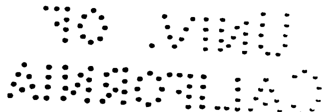


Table des matières des volumes antéreures.

ARCHIVES INTERNATIONALES

DE

Pharmacodynamie et de Thérapie

PUBLIÉES PAR

E. GLEY, Paris et **J.-F. HEYMANS**, Gand

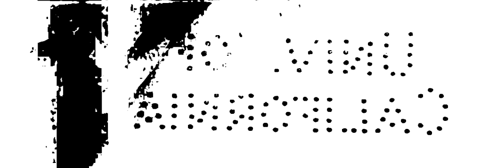
AVEC LA COLLABORATION DE

VOLUME XXVI

avec 82 figures.

BRUXELLES	PARIS
H. LAMERTIN, ÉDITEUR,	O. DOIN, ÉDITEUR
58, RUE COUDENBERG	8, PLACE DE L'ODÉON.

1922



MAISON D'ÉDITION I. VANDERPOORTEN, RUE DE LA CUILLER, 18, GAND.

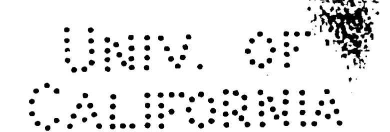


Table des matières du vol. XXVI.

LABORATOIRE DE PHARMACOD. ET DE THÉR. DE L'UNIVERSITÉ DE GAND.
DIRECTEUR : PROFESSEUR J.-F. HEYMANS.

L'excito-stimulation de l'éther en injection hypodermique est due uniquement à l'action locale

PAR

BERTHE MAY.

La plupart des médecins pratiquent fréquemment l'injection hypodermique d'éther en cas de collapsus par syncope nerveuse ou cardiaque, quelle que soit leur cause.

Dans certains pays, l'injection d'éther « in extremis » serait encore tellement à la mode que l'odeur de l'éther est, comme on a dit et écrit, caractéristique de la chambre mortuaire.

Pendant les 4 ½ années de notre service aux ambulances belges, nous avons vu appliquer et nous avons nous-même appliqué maintes injections d'éther chez les blessés.

Cela vaut donc bien la peine, nous semble-t-il, de se demander *comment* l'éther injecté agit, pour comprendre ensuite *pourquoi* il agit chez tel malade et pas chez tel autre.

Les traités de pathologie spéciale recommandent en maints endroits l'injection d'éther ; comme nous pourrions le démontrer par de multiples citations, les raisons de ces indications thérapeutiques sont absolument variables et vagues.

A la rigueur le clinicien peut se contenter de la formule thérapeutique, mais au moins les pharmacothérapeutes et les pharmacodynamistes devraient-ils nous éclairer sur le mode d'action d'un médicament indiqué et appliqué si fréquemment. Si nous consultons à ce sujet les traités classiques actuellement le plus en vogue, tels que ceux de CUSHNY, HENRIJEAN, IDE, LAUDER BRUNTON, MANQUAT, PENZOLDT, POULSON, SOLGO, RICHAUD, WOOD, etc... nous y trouvons les avis les plus contradictoires ; à cela rien d'étonnant, comme va le démontrer le résumé de la question fait en 1913 par HENRIJEAN (1), et que nous transcrivons en entier tel quel.

Après s'être demandé si l'éther est réellement un tonique du cœur, HENRIJEAN répond à cette question comme suit : « Il faut

(1) F. HENRIJEAN. *Pharmacodynamie.* Paris et Liège, 1913, p. 193.

» distinguer les faits expérimentaux et les faits cliniques. Comme le dit » HEINZ (1), l'éther est, avec le camphre, l'analeptique le plus em- » ployé. Dans un nombre incalculable de cas de collapsus, on l'a » utilisé soit en usage interne, soit en injection souscutanée, mais il » est malaisé de se faire une opinion bien nette de son action, en » s'appuyant sur les expériences des auteurs qui se sont occupés de » cette question. Les résultats obtenus ont parfois été diamétralement » opposés. Dans un travail très complet sur la valeur relative de la » pression sanguine dans la narcose par l'éther et le chloroforme, » BLAUEL (2) conclut que l'éther dans le plus grand nombre des cas » (79 %) détermine une élévation de la pression sanguine. Le chloro- » forme, au contraire, produit un abaissement de la pression dans » 81 % des narcoses. Les cas chirurgicaux, dans l'une et l'autre de » ces narcoses, étaient identiques (amputation du sein, laparotomie).

» POUCHET (3) professe que l'éther est à la fois un modérateur et » un tonique du cœur; les contractions cardiaques sous son influence » deviennent plus effectives, plus amples. C'est aussi un vaso-dila- » tateur.

» La concordance dans l'opinion des cliniciens quant à l'action » favorable dans le collapsus, la permanence de son usage comme » toni-cardiaque, malgré l'opinion de la plupart des physiologistes est » pour étonner. Il est vrai que les physiologistes et les expérimen- » tateurs sont loin d'être d'accord sur les effets de l'éther. Ainsi » PÄSSLER (4), GOTTLIEB (5), SAHLI (6), BOCK (7), LOEB (8), DEROUAUX (9), » admettent ou une action dépressive sur le cœur, ou pour le moins » l'absence d'action tonique. ARLOING (10), PENZOLDT (11), LISIN (12) » sont d'un avis contraire.

» On est en droit de se demander si les conditions pathologiques » dans lesquelles on emploie l'éther ne modifient pas les conditions de » son action. »

En 1915, PENZOLDT (13) s'exprime comme suit :

« L'éther en injection souscutanée, ou parfois par voie stomacale,

---

(1) R. HEINZ. *Handbuch d. exper. Path. u. Pharmak.* 1907. Bd. I, S. 148.

(2) BLAUEL. *Beitr. z. klin. Chirurgie.* 1901.

(3) G. POUCHET. Leçons de pharmacodynamie et de matière médicale. Paris, 1re Série, p. 297 et suivantes.

(4) *Deutsche Arch. f. klin. Med.* LXXIV.

(5) *Sem. Méd.* 1901. C. R. du XIXe Congrès de Méd. int. de Wiesbaden.

(6) *Sem. Méd.* 1901. C. R. du XIXe Congrès de Méd. int. de Wiesbaden.

(7) *Arch. f. exp. Path.*, XLI.

(8) *Arch. f. exp. Path.*, XLII.

(9) *Arch. internationales de Pharm.* XIX, pp. 63-95.

(10) *Dissertation*, Lyon, 1879.

(11) PENZOLDT. *Traité de Pharmacodynamie.*

(12) *Arch. internat. de Pharm.* XVII. p. 486.

(13) PENZOLDT. *Klinische Arzneibehandlung.* Jena, 1915. S. 161.

» est avec raison employé souvent comme stimulant contre les » collapsus. Il n'est pas facile de se prononcer avec certitude sur » l'efficacité de ce traitement. J'ai néanmoins, d'accord avec la plu- » part des praticiens, l'impression qu'en cas de collapsus subits par » maladies aiguës, tel le typhus, par aggravation d'une insuffi- » sance chronique du myocarde, ou par hémorrhagies intestinales » abondantes, les injections d'éther peuvent être d'une utilité » décisive. L'exhalation d'éther par le malade nous apprend si le » médicament a été absorbé. Comme effets collatéraux désagréables, » il y a à citer 1°) une douleur intense, mais de courtedurée (si celle-ci » fait défaut, généralement l'effet ne se produit pas à cause du collap- » sus trop avancé) 2°) l'inflammation ou nécrose qui se produit » parfois à l'endroit d'injection. »

D'après ce qui précède, il est impossible de dire comment PENZOLDT comprend l'action de l'éther injecté ; puisque l'effet de l'injection fait généralement défaut lorsqu'elle n'est pas douloureuse, on doit se demander s'il y a là simple coïncidence, ou relation de cause à effet.

En 1919, quoique dans ces dernières années aucun travail décisif n'ait, à notre connaissance, paru sur cette question, RICHAUD (1) s'exprime comme suit :

« Comme excito-stimulant l'éther est ordinairement administré » par la voie souscutanée. Ces injections sont indiquées toutes les » fois qu'il s'agit de relever la contractibilité du cœur et de stimuler » énergiquement le système nerveux. Les injections d'éther doivent » être poussées lentement dans les couches les plus profondes » du tissu cellulaire, afin d'éviter le plus possible la douleur et les » effets locaux. » C'est bien affirmer, nous semble-t-il, que l'action excito-stimulante de l'éther injecté est due uniquement à l'éther après absorption.

Pour établir comment agit l'injection d'éther, les expérimentateurs cités ci-dessus par HENRIJEAN, et bien d'autres encore, ont étudié l'action de l'éther soit sur le cœur isolé, soit sur la circulation totale après inhalation ou injection intraveineuse. De telles expériences peuvent contribuer à élucider la question, mais non la résoudre directement. En effet, l'éther comme analeptique étant administré chez l'homme en injection hypodermique à la dose de 1 cc., répété éventuellement chaque quart d'heure, la question se pose comment il agit alors, et non comment il peut agir dans d'autres conditions.

A ce point de vue spécial, nous n'avons rencontré jusqu'ici que deux auteurs qui; à proprement parler, étudient directement cette question d'une façon expérimentale.

---

(1) A. RICHAUD. *Précis de Thérapeutique et de Pharmacologie.* Paris, 1919., p. 616.

C'est d'abord R. Heinz (1) qui s'exprime comme suit :

« J'ai mesuré la pression sanguine chez des lapins auxquels » j'injectais hypodermiquement l'éther dans une patte postérieure » énervée à l'effet d'éviter l'action réflexe sur les vaisseaux et le » cœur. Après injection de 0,1, 0,5, 1,0 cc. d'éther, je n'ai pu constater » aucune modification de la pression sanguine et seulement une légère » accélération du battement cardiaque. »

Comparant ce résultat avec ceux obtenus par d'autres expérimentateurs et par les cliniciens, il arrive vaguement à cette conclusion que cette accélération cardiaque serait due à une excitation générale de l'écorce cérébrale par l'éther absorbé.

C'est ensuite J. Derouaux (2) qui dit : « Nous avons pratiqué » quelques expériences en utilisant l'éther en injection souscutanée. » et de ces expériences il conclut : « L'éther pur en injection souscutanée » chez le chien normal est capable d'engendrer une élévation de la » pression artérielle. Celle-ci est toujours relativement peu accusée, » elle peut être accompagnée d'une accélération des pulsations »

Comme on voit, les recherches directes de ces deux expérimentateurs sont loin d'avoir résolu la question du mode d'action de l'éther injecté. Elle méritait donc d'être reprise.

Nos expériences ont porté exclusivement sur le lapin, en très grand nombre : l'animal étant fixé sur le dos, la carotide est reliée à un manomètre métallique, son graphique et celui du chronographe à seconde sont enregistrés.

La première question à résoudre était celle-ci : l'éther injecté chez un tel animal modifie-t-il ou non le graphique carotidien d'une manière constante?

Après avoir essayé des doses plus petites ou plus grandes qu'un centimètre cube, nous avons adopté ensuite comme règle d'injecter uniquement cette dose et cela d'une manière parfaite dans le tissu cellulaire souscutané, ni brusquement, ni lentement, soit à la vitesse d'une injection hypodermique de morphine chez l'homme.

La dose d'un centimètre cube d'éther chez un lapin d'environ 2 kilos est, d'une manière relative, 30 fois plus grande que cette même dose chez un homme de 60 kilos ; si l'éther injecté agit après absorption, cette action générale pourrait être jusque 30 fois plus forte chez le lapin que chez l'homme ; par contre, si l'éther stimule par excitation locale des nerfs sensitifs, l'action peut être identique dans les deux cas. Démontrons d'abord que l'éther injecté modifie le

(1) R. Heinz. *Loc. cit.* S. 978.

(2) J. Derouaux. Nouvelles recherches sur l'action physiologique de l'éther sulfurique. *Arch. int. Pharm. et thér.* 1909. Vol. XIX, p 63.

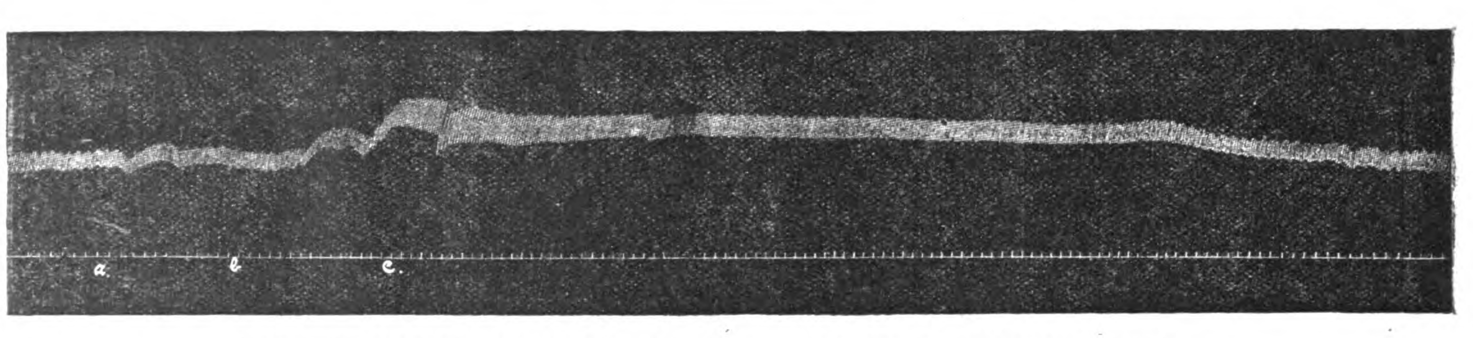
graphique carotidien : si le lapin n'est pas trop anormal, c. à d. s'il ne se trouve pas immobilisé trop fortement, ni depuis un temps trop considérable, spécialement comme nous le verrons encore plus loin, s'il n'est pas dans un état d'hypothermie trop avancé, l'injection d'un cc. d'éther détermine constamment une modification du graphique carotidien, telle que la démontre le tracé page 6 (Gr. 1), choisi parmi une cinquantaine de ce genre ; ajoutons aussitôt que cette modification circulatoire et respiratoire est souvent accompagnée d'agitation générale de l'animal réagissant à la douleur.

En résumé, quelques secondes après l'injection, en tout cas en déans 1-2 minutes, l'injection hypodermique d'un centimètre cube d'éther chez un lapin normal provoque une élévation de la pression sanguine avec augmentation de la systole, en même temps le rythme cardiaque et aussi le rythme respiratoire au début se ralentissent souvent, mais ensuite s'accélèrent. Après quelques minutes, 4 à 6, rarement plus, le graphique est redevenu et reste normal.

Cette modification circulatoire et respiratoire est-elle due uniquement à une action locale, l'éther injecté excitant directement les ramifications et les terminaisons périphériques des nerfs centripètes? ou bien est-elle due, au moins en partie, à une action générale, l'éther absorbé allant stimuler le cœur ou le système nerveux central?

La rapidité de l'action plaide évidemment en faveur d'une action locale; en effet, l'injection hypodermique de morphine, même celle du cyanure ou de la nicotine, ne se manifestent guère aussi rapidement, et loin d'être très soluble et diffusible, comme le sont les poisons précités, l'éther n'est soluble qu'à 10 % ; il faut donc 10 cc. de lymphe ou de plasma pour dissoudre le centimètre cube d'éther injecté et permettre son absorption totale; de fait, cette dissolution et cette absorption se font très lentement, comme le démontre *in vivo* la sensation de l'empâtement et de l'œdème gazeux et *in mortuo* l'odeur éthérée persistante à l'endroit de l'injection. Si l'éther injecté agissait après absorption, ce serait à dose excessivement petite, presque homéopathique, car à mesure qu'il est absorbé par le sang il s'élimine par les poumons, comme le démontre l'odeur de l'air expiré; en outre, son action devrait durer tout le temps de l'absorption, soit une demi-heure et plus. Tous ces raisonnements plaident, nous semble-t-il, contre l'action générale, pour une action locale, pour une excitation réflexe : que disent les faits?

Adréno-cocaïne. — Pour empêcher l'excitation nerveuse locale de l'éther injecté de provoquer le réflexe carotidien, nous avons d'abord songé à anesthésier préalablement la région d'injection. A cet effet, l'aiguille de la seringue étant implantée à travers la peau dans le tissu cellulaire souscutané, nous avons commencé à injecter 1-2, jusqu'à 3 cc. d'adréno-cocaïne à 1 %, puis 5-10-15 minutes plus tard, nous avons injecté par la même aiguille un cc. d'éther. Les multiples



Graphique 1. — Modification du tracé carotidien du lapin à la suite de l'injection hypodermique d'un cc. d'éther : *a)* piqûre de l'aiguille ; *b)* injection ; *c)* excito-stimulation qui se manifeste par une élévation de la pression sanguine ; une augmentation de l'amplitude pulsatile et une modification respiratoire.

expériences ainsi faites démontrent qu'on peut de la sorte diminuer la modification circulatoire, mais qu'il est exceptionnel de la supprimer complètement.

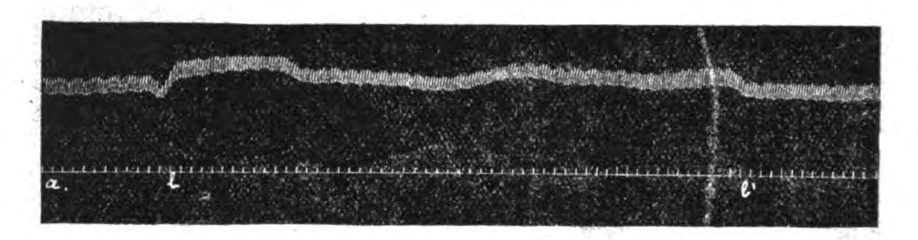
Si l'éther injecté stimule uniquement par action locale, on comprend qu'il doit en être ainsi : l'action anesthésiante locale de la cocaïne-adrénaline est forcément limitée à l'endroit d'injection, l'expérience journalière de l'anesthésie locale chez l'homme le démontre ; par contre, l'éther injecté, sous la pression de ses propres vapeurs, doit diffuser au loin dans les espaces cellulaires de l'hypoderme et atteindre ainsi des ramifications nerveuses non touchées par l'anesthésique.

Section du nerf sciatique. — Après ce demi échec de l'anesthésie locale, nous avons ensuite procédé à l'anesthésie régionale de tout un membre par la section nerveuse, c'est-à-dire par celle du nerf sciatique au niveau le plus élevé. Après cette section, nous avons constaté que l'injection d'éther dans la patte postérieure qui doit pratiquement, pour éviter de trop fortes distensions, se faire assez haut, soit au niveau de la cuisse, provoque encore des réactions circulatoires; celles-ci sont plus ou moins variables, il est vrai, mais quand même positives. Seulement, il est à rappeler que l'innervation cutanée de la patte, à la partie supérieure, se fait en majeure partie par des nerfs ne dérivant pas du sciatique et dont la section complète est, si pas impossible, au moins difficile. Quoique Heinz ne spécifie pas, nous présumons que l'énervation de la patte, dont il parle, a été également faite par section du sciatique.

Section de la moelle épinière. — Dès lors, nous sommes remontée plus haut et nous avons pratiqué la section transversale de la moelle et, instruite par les expériences précédentes, non pas dans la région lombaire inférieure, mais dans la région supérieure, c'est-à-dire au niveau de la 2e vertèbre lombaire environ, en nous guidant sur le niveau inférieur de la 12e côte. Après section de la moelle lombaire à ce niveau, tout le train postérieur et au moins les deux pattes postérieures sont complètement insensibilisées, c'est-à-dire n'importe quelle excitation remontant par les nerfs centripètes dans la moelle lombo-sacrée, ne peut plus dépasser le niveau de la section et aller porter son action sur les centres cardiaques ou respiratoires, et modifier ainsi notre graphique.

Effectivement, l'injection hypodermique, unique ou répétée, d'un cc. d'éther ne provoque plus, après la section de la moelle lombaire, ni agitation de l'animal, ni élévation brusque et notable de la pression sanguine, alors qu'une même injection, pratiquée avant ou après, chez ce même animal dans le train antérieur, détermine la réaction circulatoire habituelle. Toutefois, l'injection hypodermique d'éther dans le train postérieur, n'est pas totalement et constamment

inopérante : 10-20 secondes après l'injection dans le train postérieur, l'oscillation carotidienne devient légèrement plus ample et en même



Graphique 2. — Modification du tracé carotidien du lapin à moelle lombaire sectionnée par injection hypodermique d'un cc. d'éther dans la cuisse de la patte postérieure. *a)* injection ; *b)* augmentation légère du pouls et élévation de la pression ; *c)* retour à l'état antérieur.

temps la pression sanguine s'élève sensiblement, et cette modification persiste pendant 1 minute environ après l'injection (Gr. 2).

A quoi est due cette modification du pouls carotidien après l'injection d'éther dans le train postérieur, chez un lapin à moelle lombaire sectionnée? Est-ce à l'action générale de l'éther absorbé? Ou bien, est-ce quand même à une action locale? Les expériences suivantes vont trancher cette question, le raisonnement suivra après leur exposé.

Section et destruction de la moelle lombo-sacrée. — Après la section de la moelle lombaire au niveau indiqué chez nos lapins, le réflexe rotulien persiste ; à fortiori dans ce cas, les réflexes moins élevés, entre autres les réflexes vaso-moteurs des centres vaso-moteurs médullaires lombo-sacrés, doivent également persister; dès lors, pour faire disparaître tous les réflexes possibles qui peuvent être provoqués par l'excitation locale de l'éther injecté, il faut, après section de la moelle, détruire celle-ci. C'est ce que nous avons fait en introduisant dans le canal vertébral inférieur un gros fil de fer et en ramonant le canal à diserses reprises; on détruit ainsi complètement toute la moelle.

Evidemment la section de la moelle provoque une douleur intense ; la destruction de tout le segment médullaire lombo-sacré, détermine des convulsions dans le train postérieur, des modifications circulatoires et respiratoires, entre autres la chute de la pression sanguine et aussi un abaissement plus rapide de la température chez l'animal fixé. Celui-ci est loin d'être encore un lapin à l'état normal ; étant pathologique, il était d'autant plus intéressant d'étudier chez lui l'action analeptique de l'éther injecté, puisqu'il y a, comme le dit Henrijean, discordance entre l'observation clinique et l'expérimentation.

Train antérieur. Si on pratique l'injection hypodermique d'éther

chez un animal ainsi opéré, on peut constater les mêmes modifications de graphique que chez un animal non opéré.

Mais hâtons-nous d'ajouter qu'il se peut ne pas en être ainsi : 1° directement après le choc opératoire; 2° longtemps après, lorsque l'animal est fixé depuis 1-2 heures et que sa température est devenue très basse, celle-ci peut tomber rapidement jusqu'à 30° ; en un mot, lorsque la dépression nerveuse est déjà trop forte, en particulier lorsque l'excitabilité nerveuse a été trop diminuée par l'hypothermie, l'injection d'éther dans le train antérieur agit de plus en plus faiblement, ou même pas du tout, chez un animal à moelle sectionnée et détruite.

Train postérieur. L'injection hypodermique d'éther dans le train postérieur ne produit aucune réaction; même la réaction carotidienne, décrite plus haut après section simple de la moelle, fait défaut, alors que cette même injection chez le même lapin, pratiquée immédiatement avant ou après dans le train antérieur, déterminait une réaction caractéristique. Toutes les variations du tracé, observées après injection dans le train postérieur, sont dans la limite de celles qui se produisent spontanément.

Donc, l'injection hypodermique d'éther, d'après nos expériences, produit son action sur le pouls carotidien, uniquement par excitation locale ; celle-ci détermine l'excitation des centres nerveux, d'où elle se réfléchit, entre autres, sur l'appareil circulatoire et respiratoire, et d'où résulte la modification du pouls carotidien.

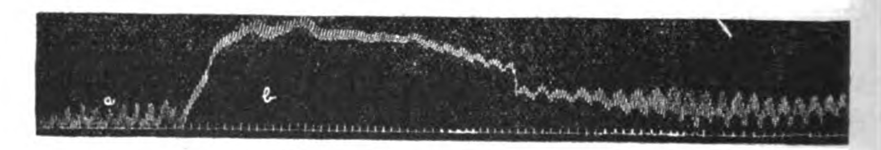
Par conséquent, la modification du pouls carotidien, observée encore chez le lapin après simple section de la moelle, ne peut pas être attribuée à l'excitation générale de l'éther absorbé ; elle s'explique naturellement par l'excitation locale périphérique, transmise aux centres vaso-moteurs lombaires, d'où elle se réfléchit sur la circulation du train postérieur, sous forme d'une vaso-constriction, refoulant le sang du train postérieur dans le train antérieur, d'où résulte l'augmentation de la systole et de la pression dans la carotide.

Personne ne contestera, croyons-nous, que l'éther, mis en contact avec un nerf isolé, l'excite d'abord, le paralyse et même le détruit ensuite. Quand on y regarde de près, pourrait-on contester que l'éther pur injecté hypodermiquement doit exciter les nerfs sensitifs, avec lesquels il vient en contact et que cette excitation sensitive, comme toute autre, doit déterminer des modifications réflexes du cœur et de la respiration, voire même de la douleur et de l'agitation générale. Évidemment, si l'animal a déjà trop souffert par l'opération et la fixation, s'il s'est déjà épuisé à lutter, il ne réagira plus et c'est là la raison pourquoi la stimulo-excitation réflexe n'est pas constante chez un animal fixé et opéré ; mais qu'on prenne un animal frais, qu'on lui injecte un centimètre cube d'éther en le mettant immédiatement

en liberté, il suffit de l'observer pour constater, que cela lui fait mal et que toujours il réagit ; n'en serait-il pas de même chez l'homme normal? Chez le lapin et l'homme malades, cette même stimulo-excitation réflexe se produira, ou non, d'après le degré d'excitabilité de son système nerveux. D'autre part, comme nous le disions déjà plus haut, le centimètre cube d'éther injecté chez le lapin, comme chez l'homme, est absorbé lentement, mais ce qui est absorbé s'élimine rapidement ; à la concentration minime que l'éther atteint ainsi dans le sang, il n'excite pas le système nerveux central (l'injection intraveineuse d'éther en solution physiologique le démontre), et il n'agit pas sur la circulation ou la respiration, pas même sur la muqueuse respiratoire au moment de son élimination avec l'air expiré. L'excitation du réflexe vaso-laryngé, ou celle du système nerveux central, lors de l'inhalation de l'éther, sont, d'après nous, le fait de doses bien plus élevées.

Comme il est dit plus haut, l'éther en cas de collapsus est administré parfois par voie stomacale ; vu son mode d'action après injection hypodermique, il est naturel d'admettre également que l'éther ingéré agit alors exclusivement par excitation réflexe sur la muqueuse stomacale, comme c'est probablement le cas aussi pour l'alcool ingéré.

Inhalation d'éther et d'ammoniaque. — Comme il est encore signalé plus haut, assez rapidement le lapin à moelle lombaire détruite ne réagit plus à l'injection d'éther dans le train antérieur ; tôt ou tard



Graphique 3. — Modification du tracé carotidien du lapin par inhalation d'ammoniaque, alors que l'injection hypodermique d'éther est totalement sans effet. *a)* début de l'inhalation: *b)* élévation considérable de la pression sanguine.

cela est également la règle, chez tout lapin lorsqu'on prolonge l'expérience pendant des heures et qu'on pratique des injections répétées. Chez la plupart de ces animaux devenus ainsi totalement inexcitables par injection hypodermique d'éther, nous avons donné à inhaler des vapeurs, soit d'éther, soit d'ammoniaque; toujours, presque jusqu'au dernier souffle, ces inhalations déterminent une augmentation notable de l'amplitude du pouls carotidien et une augmentation de la pression sanguine, ainsi que le démontre le graphique ci-dessus (Gr. 3). L'excito-stimulation réflexe de l'éther et de l'ammoniaque en inhalation est donc plus persistante et plus intense que celle de l'ét[illegible] injecté, ce qui est naturel, le réflexe naso-laryngé, nettement [illegible], étant préposé à la défense de la respiration et de la circ[illegible]

Résumé.

1°) L'injection hypodermique d'un cc. d'éther chez le lapin normal détermine une augmentation brusque et notable de la pression sanguine et de l'amplitude du pouls.

2°) L'injection préalable d'adréno-cocaïne atténue, mais ne supprime pas cette réaction carotidienne, parce que l'action locale de l'éther déborde celle de la cocaïne.

3°) La section du sciatique n'empêche pas l'action de l'éther injecté dans la cuisse de la patte postérieure, parce que l'énervation ne s'élève pas assez haut.

4°) Après section tranversale de la moelle, la modification carotidienne, provoquée par l'éther injecté, change de type; la pression s'élève légèrement et le pouls devient un peu plus ample ; les centres vasomoteurs lombo-sacrés étant excités, il se produit une vasoconstriction dans le train postérieur, d'où il résulte un refoulement du sang dans le train antérieur et une légère augmentation du débit systolique et de la pression.

5°) Après section et destruction de la moelle lombaire, l'éther injecté dans le train postérieur ne provoque plus aucune modification du pouls carotidien.

On doit donc conclure, jusqu'à preuve expérimentale du contraire, que l'injection hypodermique d'éther agit uniquement par excitation locale des fibres nerveuses centripètes, d'où résulte une stimulation du système nerveux central et, par voie réflexe centrifuge, une stimulation de la circulation et de la respiration.

6°) L'inhalation d'éther, et surtout d'ammoniaque, détermine chez le lapin une stimulation réflexe très intense de la circulation, alors même que l'injection hypodermique d'éther n'agit plus.

Gand, 30 juillet 1920.

INSTITUT DE PHARMACOD. ET DE THÉR. DE L'UNIVERSITÉ DE GAND.
DIRECTEUR : PROFESSEUR J. F. HEYMANS.

La respiration artificielle et le massage du cœur en cas d'arrêt respiratoire par les anesthésiques

PAR

C. HEYMANS,
Assistant.

Au cours de nos expériences sur les modifications des échanges respiratoires chez le lapin et le cobaye sous l'action des anesthésiques(1) nous avons fréquemment poussé la narcose jusqu'à l'arrêt de la respiration ; celle-ci, après suppression immédiate de l'anesthésique, reprend alors parfois spontanément ; si tel n'était pas le cas après 1-2 minutes, nous avons essayé d'abord de sauver l'animal en pratiquant la respiration artificielle par toutes sortes de compressions rythmées de la cage thoracique; très rarement sommes-nous parvenu ainsi à ranimer la respiration. Les animaux de nos expériences étant trachéotomisés et munis d'une canule trachéale, il nous vint un jour à l'idée de pratiquer l'insufflation pulmonaire chez un lapin dont nous avions essayé en vain de rétablir la respiration par la compression thoracique ; à notre grand étonnement, la respiration reprit très rapidement au bout de quelques insufflations.

Malgré des recherches bibliographiques nombreuses, nous ne sommes pas parvenu à trouver une étude comparée entre les deux méthodes de respiration artificielle par compression et par insufflation. En tout cas, VON BRUNN (2), qui décrit longuement toutes les méthodes de respiration artificielle par manœuvre externe et par insufflation, ne dit nulle part quelle méthode mérite la préférence.

Dès lors avons-nous entrepris systématiquement des séries d'expériences sur l'influence de la respiration artificielle par compression thoracique d'une part, et d'autre part de la respiration artificielle par insufflation pulmonaire, chez le lapin et le cobaye anesthésiés tantôt jusqu'à arrêt respiratoire seulement, tantôt jusqu'à arrêt cardiaque ; dans ce dernier cas, nous avons été amené à associer le massage du cœur à la respiration par insufflation.

(1) Ces Archives, 1921, vol. XXV, p. 491.

(2) M. v. BRUNN, Die Allgemeinnarkose. *Neue Deutsche Chirurgie*, 5. Bd, 1915. Bibliographie de 64 pages.

Nos expériences ont porté sur plus de cent animaux en variant de toutes façons les conditions expérimentales ; il est relativement facile, la dose mortelle d'un poison à injecter étant déterminée, de voir ensuite si tel ou tel traitement sauve ou non un animal mortellement empoisonné ; les anesthésiques devant, au contraire, être administrés en inhalation, il est quasi impossible de déterminer la dose simplement mortelle, et il ne reste pratiquement qu'un seul moyen d'étudier l'influence de la respiration artificielle contre les accidents respiratoires et cardiaques pendant l'anesthésie, à savoir : anesthésier d'abord les animaux jusqu'à l'arrêt respiratoire, ou jusqu'à l'arrêt cardiaque, et de pratiquer ensuite l'une ou l'autre méthode de respiration artificielle.

Comme nous le disions déjà, la respiration étant complètement arrêtée, il arrive, si on supprime immédiatement l'inhalation de l'anesthésique, que la respiration reprend spontanément ; d'après nos évaluations, cela se présente une fois sur 15 à 20 cas. Si on pratique la ventilation pulmonaire par compression thoracique rythmée, ce qui est facile, la cage thoracique du lapin et du cobaye étant très compressible et très élastique, nous estimons que sur dix animaux dont la respiration est arrêtée, on peut, si l'inhalation n'a pas été trop massive, sauver de la sorte 1-2 animaux sur 10. Par contre, en supprimant l'anesthésique et en installant immédiatement l'insufflation pulmonaire dès que la respiration est complètement arrêtée, on observe que la respiration spontanée reprend plus ou moins vite chez tous les animaux et qu'aucun ne meurt. Nous pourrions apporter à l'appui de ces affirmations, les protocoles et les tableaux de nombreuses expériences ; mais nous croyons plus utile d'exposer avec les détails nécessaires les expériences suivantes qui sont plus démonstratives pour les conclusions ci-dessus.

Pour éviter divers inconvénients et objections, tous les animaux étaient trachéotomisés au préalable, une canule appropriée étant liée dans la trachée. L'anesthésie du cobaye a été obtenue en mettant l'animal sous une cloche dans laquelle on fait circuler par aspiration de l'air chargé de vapeurs de chloroforme ou d'éther. L'anesthésie du lapin fixé a été obtenue en adaptant à la canule trachéale un système de valvules respiratoires (1), de sorte que l'animal inspire d'un côté l'air chargé d'anesthésique, et expire d'autre part dans l'air atmosphérique.

La respiration étant arrêtée, l'anesthésique est supprimé et la respiration artificielle est pratiquée soit par compression thoracique, soit par simple insufflation buccale, ce qui permet de varier à volonté la fréquence, l'amplitude et le rythme, ou bien par un appareil à respiration artificielle constitué par un soufflet mu par un moteur électrique.

(1) Cfr. ces Archives, 1919, vol. 25, p. 17.

Cobaye, 400 *gr.* — 0'00", inhalation de chloroforme ; 9'30", arrêt respiratoire ; 9'30" à 10'50", compression thoracique, sans résultat ; 10'50" à 12'00" insufflation pulmonaire ; reprise de la respiration spontanée.

Cobaye, 400 *gr.* — 0'00", inhalation de chloroforme ; 6'45", arrêt respiratoire ; 6'45", huit insufflations produisent un résultat positif immédiat ; 8'00", nouvelle inhalation de chloroforme ; 12'00", arrêt respiratoire ; 12'00" douze insufflations produisent un résultat positif immédiat.

Cobaye, 500 *gr.* — 0'00", inhalation d'éther ; 50'00", arrêt respiratoire ; 53'00", respiration artificielle par insufflation ; 53'50", reprise de la respiration spontanée. Donc, après arrêt de la respiration pendant trois minutes, l'insufflation pendant 50" donne un résultat positif.

Cobaye, 370 *gr.* — 0'00", inhalation d'éther ; 48', arrêt respiratoire ; 52'00", respiration artificielle par insufflation jusqu'à 98', pas de reprise de la respiration spontanée. Donc, après arrêt de la respiration pendant 4'00", l'insufflation pendant 46' est sans résultat.

Lapin, 2100 *gr.* — 0'00", anesthésie par le chloroforme ; 41'15", arrêt respiratoire ; aussitôt compression thoracique jusque 44'00" sans aucun résultat ; ensuite insufflation pulmonaire jusque 44'44", avec résultat positif.

Lapin, 2300 *gr.* — 0'00", anesthésie par le chloroforme ; 46'25", arrêt respiratoire ; aussitôt compression thoracique jusque 47'25" avec retour de la respiration spontanée. L'inhalation de chloroforme est reprise aussitôt ; arrêt respiratoire à 49'50" ; immédiatement compression thoracique jusque 51'50" sans aucun résultat ; insufflation pulmonaire jusque 53'30" avec résultat positif.

Lapin, 2240 *gr.* — 0'00", anesthésie par le chloroforme ; 22'20", arrêt respiratoire ; compression thoracique immédiate jusque 32'10" sans résultat ; ensuite insufflation pulmonaire jusque 35'00" avec résultat positif. Nouvelle administration d'anesthésique ; 52'25", arrêt respiratoire ; insufflation pulmonaire immédiate jusque 56' avec résultat positif.

Les extraits des expériences ci-dessus démontrent non seulement que l'insufflation pulmonaire est plus efficace que la compression thoracique, en cas d'arrêt respiratoire, mais aussi que l'insufflation agit encore après que la compression est restée sans effet ; en outre, l'insufflation permet de ranimer des animaux dont la respiration est arrêtée depuis moins de 4 minutes Par contre, lorsque nous avons essayé de prolonger l'asphyxie au-delà de 4 minutes, nous ne sommes plus parvenu à raminer les animaux par l'insufflation pulmonaire même prolongée.

Boehm (1) écrivit déjà en 1877 que l'insufflation trachéale ne peut ranimer un animal asphyxié lorsque le cœur est arrêté, et qu'il faut alors associer la respiration artificielle avec le massage cardiaque.

Cette donnée, importante pour la pratique, est confirmée par les expériences suivantes.

Cobaye, 375 *gr.* — 0'00", inhalation d'éther ; 78'00", arrêt respiratoire ; 82'00", insufflation pulmonaire avec massage du cœur ; 93'15" premiers mouvements de respiration spontanée. Donc, après arrêt respiratoire de 4 minutes, insufflation et massage cardiaque pendant 11'15" avec résultat positif.

Cobaye, 490 *gr.* — 0'00", inhalation d'éther ; 22'45", arrêt respiratoire ; 26'45",

---

(1) Boehm. *Arch. f. exp. Pathol. u. Pharm.* 1877. Bd VII, p. 84.

insufflation pulmonaire avec massage cardiaque ; 33'00", le cœur bat énergiquement ; 45'00", respiration spontanée. Donc, après arrêt respiratoire de 4', insufflation avec massage pendant 18'15" avec résultat positif.

Cobaye, 520 *gr.* — 0'00", inhalation d'éther ; 31'00", arrêt respiratoire ; 36'00", insufflation avec massage du cœur ; 47'40", cœur bat énergiquement ; 56'10", respiration spontanée. Donc, après arrêt respiratoire de 5 minutes, insufflation et massage du cœur pendant 20'10" avec résultat positif.

Cobaye, 520 *gr.* — 0'00", inhalation d'éther ; 19'05", arrêt respiratoire ; 25'05", insufflation pulmonaire avec massage du cœur ; 48'00", cœur bat lentement ; 85', cœur très faible ; 118'00", cœur imperceptible, pas de respiration spontanée. Donc, après arrêt respiratoire de 6 minutes, insufflation avec massage du cœur pendant 82'55" sans reprise de la respiration, mais il est à noter que le battement du cœur a été longtemps perceptible.

Les expériences ci-dessus, choisies comme types parmi un certain nombre d'autres, démontrent que la respiration artificielle par insufflation pulmonaire, accompagnée de massage du cœur, permet de ranimer des cobayes dont la respiration est arrêtée près de 6 minutes, tandis que l'insufflation seule s'était montrée inefficace à partir de 4 minutes.

Ce fait étant acquis chez le cobaye, nous avons étudié de plus près chez le lapin l'action de la respiration artificielle par insufflation et du massage du cœur, pendant les différentes phases de l'asphyxie et cela en enregistrant en même temps la respiration et le pouls de l'artère crurale, ce qui permet une observation plus précise que la palpation du cœur et l'inspection de la respiration.

Lapin, 2010 *gr.* — 0'00", anesthésie par éther jusqu'à l'arrêt de la respiration seulement ; 12'03", arrêt respiratoire ; 12'45", respiration artificielle par insufflation ; 12'59", le pouls crural qui était très ralenti et faible reprend déjà énergiquement ; 13'25", la respiration spontanée se rétablit.

Lapin, 2040 *gr.* — 0'00", 1re anesthésie par éther ; 20'00", arrêt respiratoire ; 22'00' insufflation et le pouls se relève directement ; 22'30", la respiration spontanée se rétablit. — 23'00", 2e anesthésie par éther jusqu'à l'arrêt du cœur ; 35'23", arrêt respiratoire ; 38'24", disparition complète du pouls crural, c.-à-d. arrêt du cœur ; 38'24," respiration par insufflation, aucun effet ; 41'24", en plus massage cardiaque ; 45'48", 1res pulsations crurales ; 58'7", la respiration spontanée reprend.

Lapin, 2040 *gr.* — 0'00", anesthésie par éther jusqu'à arrêt cardiaque ; 22'00" arrêt respiratoire ; 23'30", pouls crural totalement disparu ; 25'00", respiration artificielle par insufflation ; 31'00", pouls crural toujours nul ; en plus le massage du cœur ; 51'00", premières pulsations crurales ; 65', premiers mouvements respiratoires.

Lapin, 2200 *gr.* — 0'00" anesthésie par éther jusqu'à arrêt cardiaque ; 25'00", arrêt respiratoire ; 25'35", pouls crural nul ; 27'00", respiration artificielle par insufflation et massage du cœur ; 42'00", pulsations crurales ; suppression du massage ; pouls crural persiste jusque 62'00", mais la respiration n'a pas repris. Donc, si l'on cesse de combiner le massage cardiaque avec l'insufflation, l'animal meurt.

Lapin, 2120 *gr.* — 0'00", 1re anesthésie par éther jusqu'à arrêt cardiaque ; 32'00", arrêt respiratoire ; 32'55", arrêt cardiaque ; 33', respiration artificielle par insufflation, le pouls crural reprend immédiatement ; 33'40", respiration spontanée, — 35'00", 2e inhalation d'éther ; 36'40", arrêt respiratoire ; 37'45", arrêt cardiaque ; 38'40", respira-

tion par insufflation ; 47'40", pouls crural toujours nul : massage cardiaque et insufflation; 62', cœur toujours arrêté ; 82' idem. Donc, si l'on tarde d'associer le massage cardiaque à l'insufflation, le cœur ne reprend pas.

CONCLUSIONS.

1° La respiration artificielle par insufflation pulmonaire, appliquée endéans 4 minutes après arrêt respiratoire par le chloroforme ou par l'éther, ranime régulièrement le lapin et le cobaye, alors que la respiration artificielle par compression thoracique est inefficace dans ce cas chez quatre animaux sur cinq au moins.

2° En combinant le massage cardiaque avec l'insufflation pulmonaire, les animaux revivent jusque 6 minutes après l'arrêt respiratoire.

3° En cas d'arrêt cardiaque par anesthésie massive ou prolongée, l'insufflation pulmonaire, même immédiate, est d'ordinaire inefficace, tandis qu'associée avec le massage du cœur, elle sauve presque sûrement l'animal en ranimant d'abord le cœur puis la respiration.

L'insufflation pulmonaire est plus efficace que la compression thoracique, parce qu'elle ventile mieux le poumon et favorise davantage la petite et la grande circulation.

En cas d'arrêt du cœur, son massage est indispensable, car lui seul est capable de déterminer artificiellement la circulation nécessaire pour l'élimination de l'anesthésique et pour la désintoxication bulbaire (1).

Gand, le 15 janvier 1921.

(1) Au moment de corriger l'épreuve de ce travail nous est parvenu le tiré à part de l'article « *Massage of the heart and resuscitation* » par J. A. GUNN, paru dans le BRITISH MEDICAL JOURNAL, January 1st, 1921. Nos conditions expérimentales n'ayant pas été identiques, nous différons évidemment sur des détails, mais GUNN, comme nous, admet la supériorié de la respiration artificielle par insuflation sur celle par compression, et lui, comme nous, démontre la nécessité et l'efficacité du massage du cœur en cas d'arrêt de ce dernier. Ces données recueillies chez les animaux, d'après nous, peuvent engager le clinicien dûment qualifié à essayer éventuellement ces méthodes de traitement chez l'homme ; mais seules des observations nombreuses chez ce dernier permettront de les recommander pour la pratique courante.

FROM THE PHYSIOLOGICAL LABORATORY S. KENSINGTON, LONDON
DIRECTOR : PROFESSOR A. D. WALLER

Experiments on the action of sodium bromide on the heart

BY

W. BURRIDGE M. A., M. B.

Introductory.

Experiments made hitherto on the substitution of sodium bromide for the sodium chloride in Ringer's solution have not shown that any marked functional changes result therefrom (5). According to V. WYSS (8) most of the tissues of the body are actually indifferent to the bromide ion. He suggests that it acts indirectly by creating a chloride deficiency and, confirming HONDO (6), he found an antagonism between the chloride and bromide of sodium. BERNOUILLI (1), however, found that a theory of chloride starvation was insufficient to explain the action of bromides and suggested that they produce a real functional change by altering the state of aggregation of the colloids of the central nervous system. A small though definite difference between the actions of sodium chloride and sodium bromide was found by WALLER (7) in nerve.

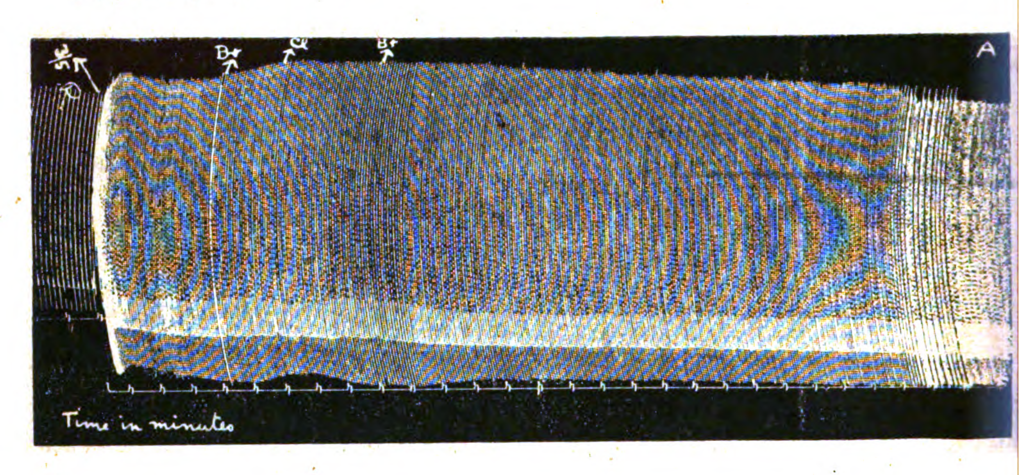
Method of Experiment.

The present experiments have been performed on the hearts of Rana Temporaria perfused *in situ* through a canula inserted into the inferior *vena cava*. The perfusing solutions were of varied composition as regards their calcium content.

GREEN and KRUSE (5) found that the cold-blooded heart perfused with isotonic sodium bromide gave almost the same cycle of changes as one perfused with the chloride and also that a bromide Ringer sustained cardiac activity as well as one made up with chlorides. Beyond a temporary and occasional increase of amplitude and rate at the moment of change from one solution to another it was not found possible to demonstrate any marked differences of cardiac reaction to chlorides or bromides.

In my own experiments sodium bromide replaced sodium chloride in Ringer's solutions and by that means I was enabled to confirm

certain of the results of GREEN and KRUSE but only for the freshly-perfused heart. Examples are given in the accompaying tracings *(See Fig. 1)*.



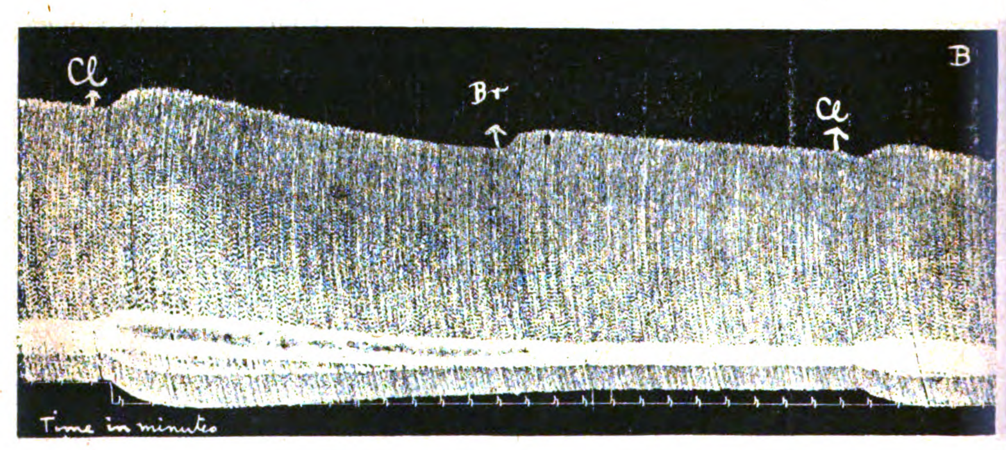


FIG. 1. — All perfusing solutions contained 0.03 % KCl, 0.01 % $NaHCO_3$. 0.015 % $CaCl_2$, and either 0.6 % NaCl or 1.056 % NaBr.
Commencement of perfusion is indicated by 3/5 R.
At ↑ Br, 1.056 % NaBr commenced to replace 0.6 % NaCl.
At ↑ Cl, 0.6 % NaCl commenced to replace 1.056 % NaBr.

The beats recorded on the extreme left of Fig. 1. A are those of the blood-containing heart before perfusion was commenced. Immediately after perfusion was started; there was an increase of rate and amplitude which can be accounted for by the facts that the temperature of the frog was in the neighbourhood of 0°C whereas of the perfusing solutions was 15°C. Sodium chloride was interchangeable with sodium bromide as regards maintaining the amplitude of con-

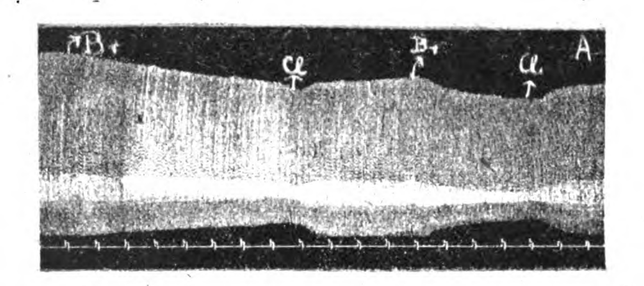
traction immediately after perfusion was established, and after perfusion had been in progress some little time the change from chloride to bromide was followed by the temporary increase of amplitude noted also by GREEN and KRUSE (5).

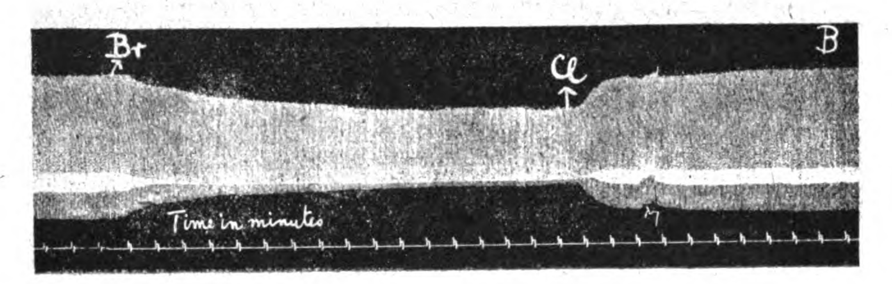
These tracings, then, confirm some of their results and also show an additional point, viz., that the overthrow of the recording lever was not quite so great when bromides were perfused as it was with the chlorides. The differences were small but definite and will be seen to have been independent of changes of amplitude for both no change and increase of the latter were accompanied by decrease of lever overthrow when the bromide of sodium replaced the chloride. In examining the diagrams it should be noted that there is a delay of about one minute between the commencement of perfusion of a new solution and the time it reached the heart consequent on the necessity of displacement of fluid already in the canula etc.

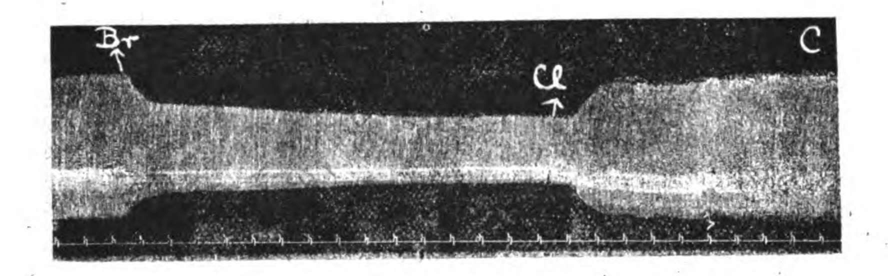
In the second tracing a slight increase in the amplitude of contraction is to be noted throughout the period of exposure to the bromides. That was an evanescent phenomenon only noted during the early period of perfusion just after the heart had begun to fail. Elsewhere I have noted an antagonism between chlorides and phosphates (2) and that failure of the perfused heart is associated with a loss of phosphates (3), so that if bromides imperfectly replaced chlorides such replacement could be accompanied by improvement if the defect were in part accounted for by ascendency of the chlorides over phosphates.

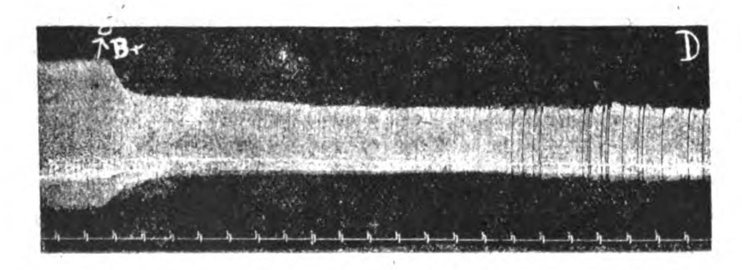
After perfusion had been in progress some little time however, sodium bromide produced definite and marked cardiac depression which was relieved by the chloride. Examples are shown in the accompanying figure *(See Fig. 2)*.

The records are those of five successive replacements of sodium chloride by bromide and vice versa, the first experiment taking place after the heart had been already perfused for about two hours. Intervals of 5 to 10 minutes consequent on alterations of writing point, level of drum etc., took place between A B C and D but E is a direct continuation of D. We note an increasing sharpness of reaction to the bromide with each new trial and also that the bromide action may be exerted in two stages, for the primary sharp reaction was followed by a further slowly increasing depression. The recovery taking place when chlorides replaced the bromide was also in two stages, a quick change followed by a slow. The events recorded cover a period of about 2 ½ hours and the height of the contractions on the chloride solution had diminished by less than 10 % over that interval whereas in presence of the bromide the diminution was over 50 % and in addition, LUCIANI groups had appeared and some heart block established.









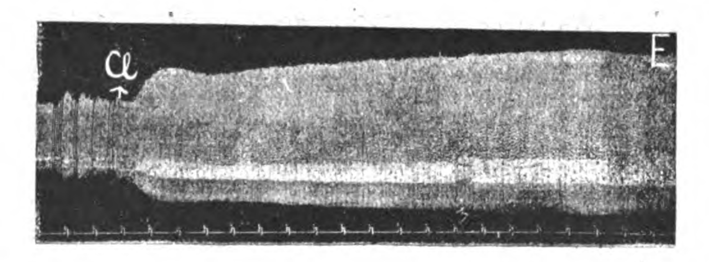


FIG 2. — All perfusing solutions contained 0.03 % KCl. 0.01 % $NaHCO_3$, 0.02 % $CaCl_2$ and either 0.6 % NaCl or 1.056 % NaBr.

At ↑ Br, 1.056 % NaBr replaced 0.6 % NaCl.

At ↑ Cl, 0.6 % NaCl replaced 1.056 % NaBr.

The changes marked M are mechanical and due to renewal of perfusing fluid in reservoir.

The capacity of sodium bromide to set up heart block is shown well in the next illustration *(See Fig. 3)*.

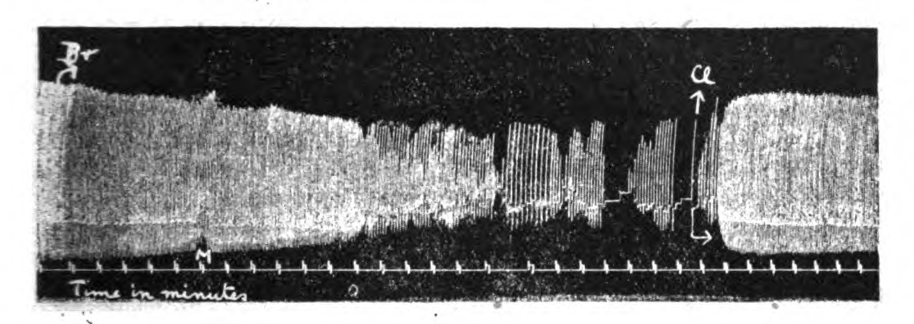


FIG. 3. — All perfusing solutions contained 0.03 % KCl, 0.01 % $NaHCO_3$, 0.015 % $CaCl_2$, and either 0.06 % NaCl or 1.056 % NaBr.
At ↑ Br, 1.056 % NaBr replaced 0.6 % NaCl.
At ↑ Cl, 0.6 % NaCl replaced 1.056 % NaBr

In this experiment there was an absence of any sharp change when the bromide solution reached the heart, but instead a gradually increasing depression which culminated in a great slowing of the heart, irregularity of the contractions and well-marked heart-block. All the defects seen to arise after the bromide were immediately removed when the chloride of sodium was again used.

Very rapid failure is, however, shown in the next illustration where also it is to be noted that a trace of adrenalin removed all the defects following on use of the bromide *(See Fig. 4)*.

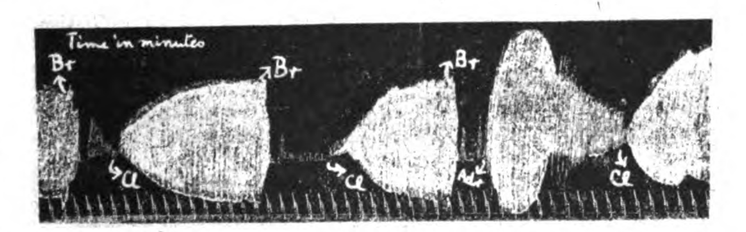


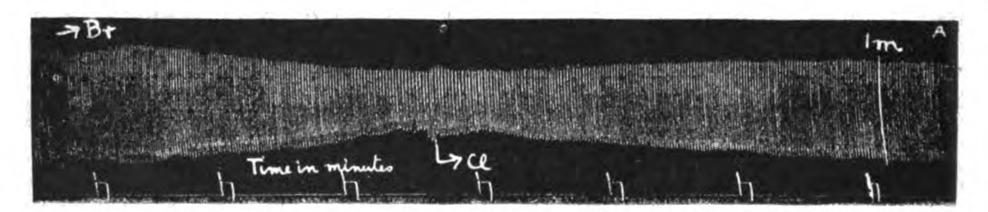
FIG. 4. — All perfusing solutions contained 0.03 % KCl, 0.01 % $NaHCO_3$, 0.025 % $CaCl_2$, and either 0.6 % NaCl or 1.056 % NaBr.
At Br, 1.056 % NaBr commenced to replace 0.6 % NaCl.
At Cl, 0.6 % NaCl commenced to replace 1.056 % NaCl.
At Adr, one drop of adrenalin was placed in the canula and perfusion continued of the bromide solution.

The nature of the bromide depression was investigated by the potassium method described elsewhere (4). It was found that depression of the height of the spontaneous contractions produced by sodium bromide was not accompanied by any change in the height of the contraction produced by a 5 % solution of potassium chloride so that

the decreased height of these spontaneous contractions was not consequent on any inability of contractile material to contract. There must, therefore, have been some loss of efficiency of the exciting mechanism brought about by the substitution of sodium bromide for the chloride.

ZUNZ (9) showed that hearts after continuous perfusion with Ringer's solution become more sensitive to the depressing action of drugs and the results noted above accord with this in that they show that sodium bromide produces much greater depression after perfusion has been in progress some time. I find, however, that this time factor is greatly diminished when solutions of small calcium content are perfused. As an example a solution similar to those used above, but containing only 0.005 % $CaCl_2$ may be taken. The heart perfused with it remains active for about four hours, but when in that solution sodium bromide was substituted for the chloride, the period of activity was curtailed to about one hour.

The heart perfused with the solution began to fail shortly after perfusion was begun when sodium chloride was replaced by the bromide. Two successive experiments done on a heart are recorded in the accompanying tracings *(See Fig. 5)*.



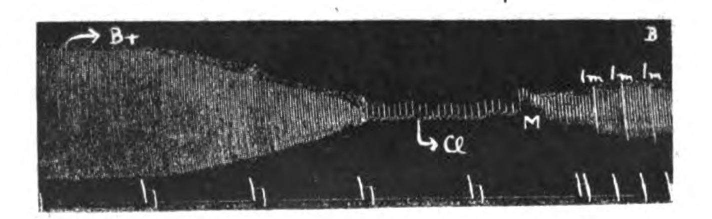


FIG. 5. — The perfusing solutions contained 0.03 % KCl, 0.01 % $NaHCO_3$, 0.005 % $CaCl_2$ and either 0.6 % NaCl or 1.056 % NaBr.

At ↑ Br, 1.056 % NaBr commenced to replace 0.6 % NaCl.

At ↑ Cl, 0.6 % NaCl commenced to replace 1.056 % NaBr.

1 m = one minute interval.

M = mechanical effect due to movement of apparatus.

On the first occasion depression was chiefly of height of contraction, and on the second there was in addition marked slowing of rate with prolongation of the A-V interval. Recovery from the first exposure to bromide was complete, whereas from the second exposure it was incomplete.

The diminution of height of contraction noted to the right of the second tracing was definite and marked, but nevertheless it did not imply any great cardiac defect for the heart not only beat well when a similar solution of greater calcium content was perfused, but was used for other experiments over a further period of five hours and beat well on their conclusion. The defect was no greater than that to be noted at the conclusion of the events recorded in the first figure, for test was made there of the capacity of the heart to beat on this particular solution, and it was found that the height of the beats were thereby diminished to about one-third that shown. The solution of small calcium content can magnify, as it were, otherwise small changes, and so in these experiments enabled certain of the defects produced by the bromide to appear earlier than was the case where the other solutions were used.

Theoretical.

The actions to be ascribed to bromides are those which came on when sodium bromide replaced sodium chloride, and disappeared when the chloride replaced the bromide. They were slowing of rate of dilatation, of rate of beat, of conduction and depression of height of contraction, but only the first of these actions might be found, the others depending on a sensitisation of the heart to the bromide brought about by perfusion or reduction of the calcium content of the perfusing solution. It is possible, however, that the slight inefficiency of dilatation may be the prime effect and the others secondary consequences of this, for the processes of diastole not only reverse systole but also prepare the heart to respond to the next excitation. A slight inefficiency of those preparatory processes would eventually culminate in a slowing of rate and diminished magnitude of the response to the next excitation.

In the body most tissues are indifferent to the bromide ion save the central nervous system, but unless central excitatory processes fundamentally differ from peripheral these experiments on a peripheral organ rendered sensitive to bromide action should throw light on this central action of bromides. On that basis one would suggest that bromides primarily affect and depress recovery processes, and that this action eventually culminates in a diminished capacity to receive a new excitation. To the depression of recovery processes the primary feeling of fatigue associated with bromides is to be ascribed, and their hypnotic action to be a later stage of, and consequent on, that same depression. The non-refreshing character of the bromide sleep would also follow on an inefficient recovery process.

Summary.

1. The substitution of sodium bromide for sodium chloride in Ringer's solution eventually brings about a marked impairment of the functional capacity of the heart.

2. Impairment appears earlier when the calcium content of the perfusing solution is reduced.

3. It is suggested that bromides impair recovery processes.

In conclusion I wish to express my indebtedness to Professor A. D. WALLER for the facilities afforded me to carry out the work.

References.

1. BERNOUILLI. — *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 73, p. 353, 1913.
2. BURRIDGE. — *Journal of Physiology*, 54, p. 248, 1920.
3. BURRIDGE. — *Ibid. Proc. Physiol. Soc.*, p. 1, 1914.
4. BURRIDGE. — *Quart. Journ. of Medicine*, 9, p. 43, 1915-16.
5. GREEN & KRUSE. — *Journ. of Amer. Med. Assn.*, 1913, II, p. 271.
6. HONDO. — *Berl. Klin. Woch.*, 1902, N° 10.
7. WALLER. — *Brain*. Part LXXIV, p. 277, 1896.
8. V. WYSS. — *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 53, p. 266, 1906.
9. ZUNZ. — *Trav. du lab. de Therap.*, Bruxelles, 1908-9.

LABORATOIRE DE PHARMACODYNAMIE DE L'UNIVERSITÉ DE LOUVAIN.
DIRECTEUR : PROFESSEUR M. IDE.

Pénétration du chloroforme dans l'organisme

PAR

Dr H. MAGOS.

APERÇU HISTORIQUE.

La théorie de l'absorption du chloroforme n'a commencé à s'établir que par les expériences de PAUL BERT.

Ce savant posait en principe « que l'action des gaz et des vapeurs sur l'être vivant est réglée par leur tension partielle ». Et toutes les expériences de P. BERT tendent à déterminer sous quelle tension le chloroforme arrive à produire ses effets. Le résultat est assez conforme à la théorie. Chez le chien, la dose de 10 gr. pour 100 litres insensibilise rapidement, sans tuer avant 2 ½ h.; la dose de 8 gr. ne donne plus que tardivement une insensibilité et, à 6 gr. pour 100 litres, la narcose ne se produit plus pratiquement.

A ce moment, les dosages de chloroforme dans le sang et dans les tissus n'étaient guère exécutables, à fortiori le dosage exact des atmosphères présentées. En se tenant aux constatations de P. BERT, on arrivait à cette conception que le chloroforme suit les mêmes lois que l'oxygène. Et on disait avec DASTRE « que l'organisme absorbe du chloroforme jusqu'à ce que la tension de la vapeur de cette substance dans le sang soit égale à sa tension dans l'atmosphère offerte ; à partir de ce moment, le sang et les tissus saturés n'empruntent plus rien à l'atmosphère anesthésiante ; le mélange extérieur ne se détritre plus. »

Les écoles anglaises et américaines ont essayé, ces dernières années, de multiples méthodes d'anesthésie à l'éther et au chloroforme et ne mettent pas cette idée en discussion ; toutes tendent à régulariser l'absorption par le « rebreathing », c'est à dire en faisant expirer le malade sous un masque, pour que l'éther exhalé ne se perde pas et que l'équilibre de tension obtenu se maintiennent automatiquement.

Les admirables méthodes d'analyse élaborées par NICLOUX ont permis de suivre le chloroforme dans le sang, dans les tissus et de le doser facilement n'importe où il se trouve.

Sans elles, nous en resterions indéfiniment aux données assez grossières de P. BERT.

Toutes les méthodes antérieures sont d'application malaisée et donnent des résultats douteux.

Les méthodes de NICLOUX ne sont pas seulement d'une exécution facile et élégante, mais elles sont d'une précision telle que l'expérimentation physiologique ne saurait demander plus. Nous avons plusieurs fois soupçonné des causes d'erreur, devant les résultats surprenants que nous trouvions: vérification faite, la méthode n'était jamais en défaut; c'étaient les prévisions qui étaient bouleversées par les résultats. Mais NICLOUX, tout en renseignant les doses de chloroforme dans le sang et les tissus, n'apporte guère de restrictions à l'idée fondamentale des équilibres de tension. Il donne le pourcentage du chloroforme dans le sang aux stades de narcose simple et de narcose mortelle, et surtout le cycle de la décharge du sang après la narcose (tous détails qui nous préoccupent vivement) puis il fait un tableau de la répartition du chloroforme dans les divers tissus de l'animal chloroformé. Cela intéressait surtout les partisans de la théorie des lipoïdes, selon MEYER et OVERTON ; et il est usuel de répéter depuis lors que le chloroforme s'accumule dans les tissus dans l'ordre décroissant suivant : tissu graisseux, tissu nerveux, foie et rein, rate, muscle strié. Constatation stupéfiante, on devrait plutôt conclure le contraire si on regarde les chiffres mêmes de NICLOUX, dont on prétend tirer cette conclusion.

Mais cette question ne nous intéresse pas spécialement ; nous tenons seulement à ne pas verser dans des théories mal prouvées.

TISSOT a repris cette question, en 1906, dans deux mémoires : il montre surtout que le pourcentage de l'atmosphère dans laquelle l'animal est placé n'est pas seul à déterminer la narcose ou la mort ; l'activité respiratoire intervient pour rendre son influence plus ou moins efficace. Le taux de chloroforme dans le sang n'a pas la valeur que NICLOUX lui attribue. TISSOT trouve parfois le sang momentanément chargé au delà de la dose mortelle de NICLOUX, et l'animal ne paraît pas en danger ; d'autrefois, il ne trouve pas la dose narcotique de NICLOUX et l'animal est parfaitement anesthésié. Finalement, en provoquant une polypnée, il atteint l'anesthésie dans une atmosphère qui ne contient que 3% : moins de la moitié de ce qui est normal.

Analysons de plus près les données par lesquelles TISSOT prétend établir ses conceptions, qui intéressent au plus haut point notre travail.

1° TISSOT présente un mélange de 3 à 4 grammes pour 100 litres, et il exerce une « polypnée vive par des pressions manuelles sur le thorax : cette manœuvre a fait passer le débit respiratoire de 3 litres ;

à 35 litres : cela dure 4 minutes. A ce moment, il y a syncope respiratoire durant 2 minutes et pendant cette syncope une émission d'urine indiquant que la mort était proche. »

On est en droit de se demander si de pareilles manœuvres durant 4 minutes ne sont pas pour beaucoup dans la chute de la pression qui commence *immédiatement* dans le graphique de l'auteur, certainement avant que le chloroforme ait pu atteindre sérieusement les tissus nerveux. On se demande aussi si la syncope respiratoire n'est pas une simple apnée, et si l'émission d'urine a la signification grave qu'il indique.

Le laconisme de l'auteur sur ses façons d'expérimenter ne permet pas de juger mieux de ces faits.

Il en conclut que ce n'est pas la tension de vapeur du chloroforme dans le mélange anesthésique qui importe le plus, mais sa tension à l'intérieur de l'alvéole pulmonaire qui seule règle la pénétration du chloroforme dans le sang.

Personne ne contestera cela : mais TISSOT admet-il qu'un animal qui respire, durant des minutes, un mélange fixe d'air et de chloroforme n'établit pas à peu près l'équilibre entre l'air alvéolaire et l'extérieur? en tous cas la différence n'atteint pas une proportion de 50%.

Or TISSOT prétend obtenir un effet avec moins de 50 % de la dose anesthésiante usuelle. Pour tuer en 4 minutes sans la polypnée, il faudrait même 6 fois plus de chloroforme, selon P. BERT.

Il doit y avoir une faute technique dans ces manœuvres.

2° S'occupant du chloroforme dans le sang, TISSOT fait une expérience pour déterminer combien de chloroforme est pris par le sang secoué vivement avec une atmosphère à 8 gr. de chloroforme pour 100 litres. Il prend 100 gr. de sang de chien dans un flacon de 1 litre maintenu à 38° : il fait passer de façon continue l'air à 8 %, il agite vivement le sang dans le flacon pendant 1 1/4 h. Le dosage donne 90 milligr. pour 100 de sang.

Or, on ne trouve jamais dans le sang, même après des heures de respiration du même air, que 35 à 50 milligr. pour 100 gr. de sang : fait conforme aux données nombreuses de NICLOUX et de TISSOT lui-même.

On peut regretter que le titrage du sang agité avec l'atmosphère chloroformée soit resté unique.

Nous verrons pourtant qu'il est à peu près exact.

TISSOT conclut que jamais le sang n'est en équilibre de tension avec le milieu alvéolaire.

On pourrait lui objecter que le dosage du chloroforme n'établit pas la tension des vapeurs : le chloroforme en excédant dans le sang, secoué durant 5/4 d'heure dans ce flacon, pouvait y être sous une forme liée à des lipoïdes ; on peut supposer aussi que le sang sorti depuis si longtemps a une plus forte capacité d'absorption que le sang vivant.

Le doute reste donc attaché à cette conclusion.

3° Tissot trouve la cause de ce manque d'équilibre dans l'absorption du chloroforme par les tissus au passage du sang à travers ceux-ci.

Il dose au même moment le chloroforme dans la jugulaire et la carotide et il trouve 53,2 pour la carotide et 48,1 pour la jugulaire.

Une autre fois, il trouve 38,7 pour la carotide et 35,3 pour la jugulaire et une troisième fois 43 pour la carotide et 38,8 pour la jugulaire.

Nous ferons remarquer ici que le sang ne perdrait dans toutes ces expériences qu'un dixième de son chloroforme au passage dans les tissus :

5,1 pour 53,2 ;
3,4 pour 38,7 ;
4,2 pour 43.

On est bien étonné de voir conclure après cela que ce transport vers les tissus est la cause du manque d'équilibre de tension entre le sang et l'atmosphère respirée. Il est impossible de ne pas conserver beaucoup de défiance sur l'ensemble de ces conclusions et de ces interprétations.

Les autres expériences de Tissot visent moins directement le fond de la théorie qui nous intéresse.

Les expériences de Kochmann et de ses élèves ne touchent pas à ce point de doctrine ; elles montrent seulement combien l'administration d'atmosphères titrées est délicate et difficilement réalisable.

Telle est, vue d'ensemble, l'évolution de la théorie concernant la narcose chloroformique.

Nous nous arrêtons plus spécialement sur les détails au cours des divers paragraphes de notre travail.

BUT ET HYPOTHÈSE DE TRAVAIL.

Nous avons été entraîné indirectement à reprendre cette étude. Ayant commencé des expériences sur les associations de médicaments narcotiques, chloral et chloroforme, luminal et chloroforme, éther et chloroforme, etc., nous nous heurtons d'abord à des idiosyncrasies de lapins qui exigent constamment des doses de 50 % plus fortes de chloroforme, avant de dormir.

Ce fait intéressant méritait d'être fouillé et c'est en dosant le chloroforme dans le sang, en prenant la tension des vapeurs de chloroforme dans l'air exhalé, en répétant le barbotage d'atmosphères titrées à travers l'eau physiologique, le sérum et le sang, que nous fûmes amené à nous attaquer au problème même que Tissot a posé.

Il faut mieux connaître :

1° les rapports de l'atmosphère extérieure et celle des alvéoles ;

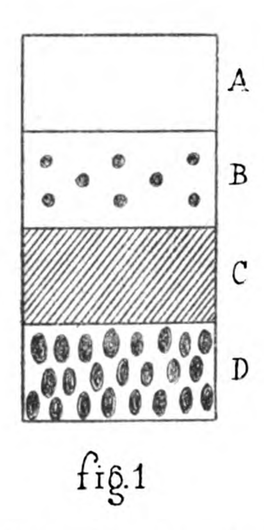
2° il faut savoir à quelle tension de vapeurs le chloroforme se trouve dans le sang, une tension déterminée étant offerte à l'animal;

3° il faut connaître le débit du chloroforme dans les tissus.

Nous fûmes amené à croire que l'équilibre entre l'atmosphère et le sang, entre le sang et les tissus, est encore plus troublé que TISSOT ne le soupçonne.

L'avidité avec laquelle le chloroforme de l'air est retenu par un tuyau de caoutchouc qu'il doit traverser, le déchargement rapide du sang qu'on laisse s'écouler par un tube de verre dont la face interne est recouverte de cire, sont des faits frappants.

Or le sang chloroformé traverse des milieux chargés de lipoïdes, et le corps de la plupart des animaux présente des dépôts de graisse notables, susceptibles certainement d'accaparer beaucoup de chloroforme. Le serum sanguin lui-même peut devenir laiteux au cours des digestions, tant il peut contenir des graisses en suspension et, s'il fallait en croire NICLOUX, le globule rouge serait capable d'accaparer le chloroforme de façon à retenir 88 °/₀ du chloroforme global trouvé dans le sang : ce serait encore une fois du chloroforme lié, soustrait à a tensi on du sérum.



A, représente l'atmosphère chargé de chloroforme ;
B, le sang porteur d'une faible portion de lipoïdes ;
C, le tissu maigre ;
D, le tissu fort chargé de graisses.

On se trouve donc devant le jeu combiné de facteurs certains et nous schématisons comme suit la succession des milieux rencontrés par le chloroforme qui pénètre dans l'organisme. Voir fig. 1.

Notre hypothèse de travail est donc la suivante : dans les milieux A. B. C. D. la tension de vapeur de chloroforme tend à s'équilibrer,

grâce aux lois inéluctables des tensions physiques ; mais les lipoïdes disséminés sur le trajet tendent à troubler ces équilibres.

L'action troublante dominera-t-elle et jusqu'à quel point?

Remarquons qu'il s'agit de tensions très faibles et de quantités de chloroforme pondérables, mais minimes.

Un litre de vapeur de chloroforme à la tension atmosphérique pèse selon les lois physiques, 5 grammes (proportionnellement au poids moléculaire).

Or, 1° dans les atmosphères présentées, il n'y a que 5 à 10 centigr. par litre soit un centième à un cinquantième d'atmosphère ;

2° un poumon rempli d'air d'un animal pesant 1 kilogr. ne contiendra que peu de milligr. de chloroforme.

3° tout le sang d'un animal pareil en narcose ne contiendra que 3 à 8 centigr. de chloroforme circulant.

Les causes troublantes en exerceront une influence d'autant plus prépondérante. Surtout les tissus gras devront avoir une influence qui nous paraît fort négligée par les auteurs, même par TISSOT.

NICLOUX a envisagé le problème de la saturation des lipoïdes au cours de l'anesthésie, mais il se limite aux tissus nerveux qui offrent 10 à 20 °/₀ de matière extractible par le chloroforme lui-même.

Nous verrons au cours du mémoire que cela n'a aucun rapport avec ce que nous envisageons dans notre hypothèse.

Comme nous le verrons, son unique expérience sur le lait de la chèvre anesthésiée cadre beaucoup mieux dans notre hypothèse.

Mais l'exécution de ces expériences était semée d'écueils. Que de fois nous avons du modifier nos appareils, que de causes d'erreurs tardivement constatées et forçant de tout recommencer : chloroforme n'ayant pas sa charge en chlore, fuites de gaz des appareils dès que la tension s'élève, absorption de chloroforme par les caoutchoucs, etc. On finit par installer des contrôles à tous les points critiques de l'expérience, à ne se fier à une atmosphère titrée qu'après en avoir contrôlé le titre.

Nous verrons cela dans la succession de nos expériences.

Mais qu'il nous soit permis de protester contre toutes les descriptions sommaires d'installations et contre l'absence de protocole des expériences, quand il s'agit de faits aussi labiles, aussi susceptibles de critique.

Nous ne nous faisons pas illusion, des causes d'erreur nous ont encore échappé certainement ; car il ne s'est pas passé de semaine sans que nous n'en découvrions encore, là où nous croyions avoir toute sécurité.

A mesure que les appareils grandissent et se compliquent, les dangers d'erreur se multiplient en proportion géométrique.

INSTRUMENTATION.

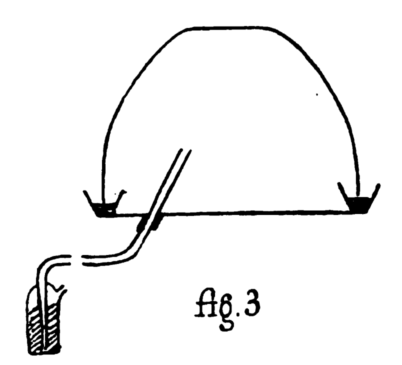
Nous avions le choix des appareils pour donner à nos animaux des atmosphères titrés depuis ceux de P. BERT jusqu'à ceux de KIONKA et de KOCHMANN, de TISSOT ou de NICLOUX.

La cloche fermée nous a toujours paru la plus sûre pourvu que la fermeture fut hermétique, et qu'il n'y eut aucune substance absorbante dans les parois.

Nous avons disposé dans nos expériences de 3 cages de dimensions différentes. Une grande cage de 630 litres vitrée de tous côtés, à peu près cubique à encadrement de bois, placée sur table de bois. Une seule porte latérale y donne accès : elle écrase à plat, en se fermant, un tube de caoutchouc qui sans interruption fait le tour du panneau de fermeture. Toutes les fissures et tous les joints étaient soigneusement mastiquées par l'intérieur. Un grand rideau de tulle était pendu en travers de la cage pour recevoir le chloroforme.

Malgré tous nos soins, nous croyons que cette cage avait des pertes, car il fallait toujours un peu plus de temps pour atteindre la narcose. Mais cette cage ne servit qu'à faire des anesthésies sur des groupes de 4 à 6 animaux à la fois pour dépister les anormaux. Comme les animaux se contrôlaient réciproquement, de légères pertes restaient sans conséquences.

Nous avions ensuite une cloche en verre de 20 litres, fig. 3


fig. 3

placée sur un plateau de zinc ayant un rebord en gouttière, qu'on remplissait d'eau. Ici toute absorption ou toute fuite était exclue. Les quelques centimètres cubes d'eau en contact avec l'atmosphère absorbent à peine des traces si les surfaces sont calmes. Pour les expériences précises on pouvait mettre de l'eau en équilibre de tension avec l'atmosphère prévue comme pour la cage suivante.

Cette cloche servit surtout à des expériences physiques et à mesurer l'exhalation de chloroforme après narcose.

Enfin notre cage principale fig. 2 et 5 destinée à toutes les

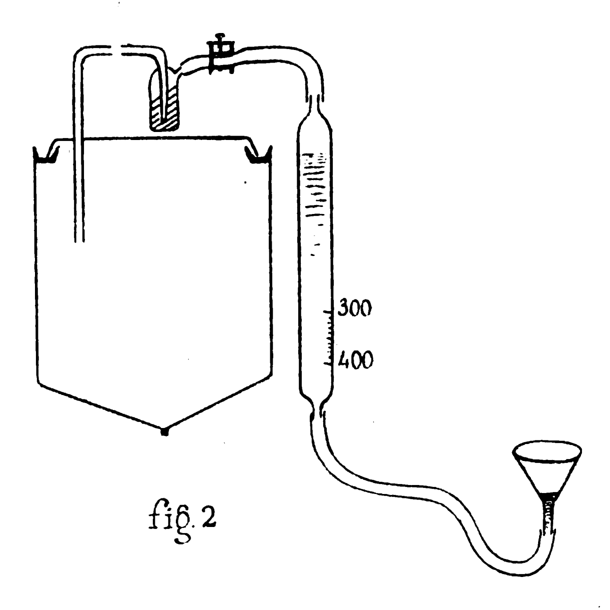


fig. 2

expériences délicates avait une armature en fer forgée avec vitres sur les 4 côtés.

Elle contenait 75 litres. Le fond portait une tubulure, le bord supérieur étant en gouttière pour recevoir le couvercle ; cette gouttière était remplie d'eau chloroformée (200 cc. suffisait pour tout le carré) ; cette eau était préalablement chargée de chloroforme aux taux de 0,7 cc. par litre donc sensiblement en équilibre, avec les atmosphères narcotisantes.

Une tubulure dans le couvercle permettait une seconde prise d'air dans le système. Pour uniformiser les vapeurs de chloroforme un carton ventilateur était mu à la main par une tige recourbée qui passait par la gouttière.

Cette cage pouvait recevoir facilement deux lapins pour une demi-heure sans autres précautions. Quelques bâtons de soude caustique, debout dans un petit vase enlevaient le CO_2 des expériences plus longues.

Nous pouvions aussi réduire le volume par l'introduction de cylindres soudés ce que nous fîmes parfois pour aboutir à 50 litres de capacité (expériences d'absorption du chloroforme durant la narcose).

Cette cage avec ses deux tubulures fermées conservait un taux constant de chloroforme durant deux heures au moins : ni perte, ni absorption. Elle servit ainsi pour les titrages les plus délicats.

Pour livrer l'atmosphère voulue à des animaux trachéotomisés, plutôt que d'employer des systèmes comme ceux de Tissot, Kionka, Cushny ou Kochmann, nous préférâmes nous en tenir à la cage fermée.

C'est à dire que nous servant des 2 tubulures de notre cage de 75 litres nous y adoptons un circuit fermé en tubes de verre ayant sur son trajet une pompe aspirante et foulante, formée par une cloche de verre de 300 cc. plongeant sur mercure avec soupapes de métal et de mica. Un moteur soulève et abaisse cette cloche 12 à 24 fois par minute.

L'air circulant dans ce circuit, d'une capacité d'environ 1/2 litre, ne rencontre aucune graisse et seulement des traces de caoutchouc aux 7 joints inévitables, reliant les bouts de verre toujours directement juxtaposés.

MADELUNG croit que le caoutchouc est perméable au chloroforme, ce n'est pas de la perméabilité mais de l'absorption, « le chloroforme étant le meilleur dissolvant du caoutchouc » (dictionnaire de Wurtz).

Quand nous avions un circuit de 5 mètres de tubes en caoutchouc, nous le trouvions capable d'absorber en 1 heure la majeure partie du chloroforme d'une atmosphère narcotisante.

Ce système nous permet de faire respirer l'animal trachéotomisé sur un courant d'air identique à l'atmosphère que prendrait l'animal en cage.

Ce circuit nous permettait aussi dans certaines circonstances exceptionnelles de prendre un échantillon d'air, quoique le plus souvent nous avons eu recours à une prise directe que nous décrirons plus loin.

La rigidité des tubes avait un inconvénient que nous n'avons découvert qu'après avoir perdu une série d'animaux, et chaque fois en peu de minutes. La pompe agissant sur le circuit ne trouve de compensateur de volume que dans la cage, dont le couvercle assez léger obéit avec l'eau de la gouttière aux légers changement de pression opérés par le pompage. Mais dans les tubes l'effet de la pompe est rapidement fatal à l'animal. Celui-ci mis sur le tube d'aspiration recevait des coups de tension négative de 20 cm. d'eau à chaque lever de la cloche qui pompe ; immédiatement il cessait sa respiration et suivait les mouvements de la cloche; il mourrait en peu de minutes. Mis sur le tube d'expulsion, il avait le poumon écrasé par une insufflation forcée à chaque descente de la cloche.

Nous mîmes alors sur une bifurcation une petite vessie très souple de porc, au niveau de l'animal environ et le mal était réparé ; l'animal conservait sa respiration spontanée, la vessie suivait tous les mouvements de la pompe, et l'animal ne présentait plus aucun malaise respiratoire.

Ce système nous permettait aussi avec une aisance remarquable, de remplacer l'animal par des barboteurs chargés d'eau, de sérum ou de sang et d'y produire un vif courant d'une atmosphère facile à titrer ; ceci pour vérifier ainsi les pouvoirs d'absorption de ces liquides pour des doses données de chloroforme.

MÉTHODES CHIMIQUES.

Nous avons adopté, dans leurs grandes lignes, les excellentes méthodes de NICLOUX.

Pour le chloroforme du sang, nous cueillons directement le sang en jet par une canule en verre dans un vase pesé, chargé de 100 cc. d'alcool concentré et de 5 cc. d'alcool acidulé à l'acide tartrique à 5 %. Quand la saignée doit dépasser 30 gr., nous doublons ces quantités. Une nouvelle pesée après la saignée nous indique, à 5 centigr. près, le poids du sang recueilli. Distillation avec interposition d'un déflegmateur ; 50 cc. (respectivement 110 cc.) d'alcool sont recueillis avec les précautions d'usage pour que rien ne se perde, surtout au début de la distillation Le distillat chargé de 10 cc. de soude alcoolique à 10 % est bouilli au refrigérant vertical durant 20 à 30 minutes. Aucun bouchon en caoutchouc n'était en usage.

Puis on dose les chlorures.

Le chloroforme de l'air des appareils fut dosé pour chaque expérience précise. Malgré la perfection de nos cages, nous avions appris que des pertes existaient toujours par les manipulations d'installation. Pour recueillir un volume déterminé d'air chloroformé, nous suivîmes d'abord la méthode de NICLOUX : recueillir un courant d'air dans un vase à deux tubulures, vase de 300 cc.; chasser ensuite cet air par du mercure, à travers un barboteur en spirale chargé de 50 cc. d'alcool. Chaque bulle reste 5 à 6 secondes en contact avec l'alcool, passage lent de moins d'un litre à l'heure.

C'était extrêmement encombrant, et les dosages étaient souvent perdus ou erronés : fuites d'air aux bouchons, vapeurs d'eau condensées dans le flacon, etc.; de plus, nécessité de pomper longtemps le gaz à analyser dans le circuit fermé que nous venons de décrire.

Bien nous en prit de supprimer tous les intermédiaires.

Dans la cage dont nous voulons titrer l'atmosphère, fig. 2, p. 34, nous faisons plonger un tube en verre coudé auquel s'ajuste directement le barboteur : contact des deux tubes en verre maintenus par un tube en caoutchouc. L'aspiration de l'air se fait par différence de niveau dans un système simple et commode représenté ci-joint; ici le caoutchouc n'ayant plus d'inconvénients, un gros tube relie le barboteur au tube gradué permettant de mesurer, à 2 ou 3 cc. près, l'air aspiré. Quand le volume d'air désiré a passé, on relève l'entonnoir pour rétablir la tension atmosphérique jusque dans le barboteur, puis lecture est faite en tenant au même niveau l'eau de l'entonnoir et du tube gradué.

La température est la même dans l'appareil et dans la cage, elle n'intervient donc pas dans l'estimation.

Ainsi notre prise d'air évitait le pompage, les dangers du flacon à 2 tubulures, le transvasement par mercure et nous livrait, en 15 à 20

minutes le chloroforme dissout dans l'alcool, tandis que chaque prise exigeait antérieurement plusieurs heures avec surveillance rigoureuse.

L'aspiration se réglait à volonté par la pince à vis posée sur le tube en caoutchouc.

Nous n'avons pas encore le barboteur de Villiers que NICLOUX décrit et qui permettra de finir la prise d'air en 2 minutes (25 litres à l'heure.).

Pour doser le chlorure du chloroforme saponifié par la soude alcoolique bouillante, nous n'avons pas adopté, comme NICLOUX, la méthode le dosage à l'état neutre, en présence du chromate. La méthode classique de VOLHARDT en milieu acide (acide nitrique), avec contre-titrage au sulfocyanure, et alun de fer comme indicateur, est certainement la plus précise. L'erreur possible ne comportait que 2/10 de milligr. de chloroforme. Quand le dosage se fit sur de minimes quantités et que l'erreur multipliée par les calculs comporte une valeur de 10 % du chiffre obtenu, nous le signalerons dans notre mémoire.

Un dosage en blanc de la soude, de l'acide nitrique, de l'alcool et de l'eau distillée nous avait mis à l'abri de toute souillure chlorée. Les vases employés ne servaient jamais qu'au même dosage et n'étaient rincés qu'à l'eau distillée.

A part ces modifications de détail, les méthodes de NICLOUX sont exactes. A des moments de doute, nous avons chargé du sang, du lait et de l'huile de doses connues de chloroforme et nous avons retrouvé exactement les chlorures correspondants dans le titrage final.

Nous n'avons pas essayé d'autres méthodes de titrages de chloroforme ; les méthodes volumétriques adoptés par l'école de KOCHMANN paraissent susceptibles d'exactitude ; mais quand on lit toutes les critiques que KOCHMANN fait des méthodes de ce genre employées avant 1912, on peut craindre qu'une erreur lui échappe encore.

L'estimation des volumes de gaz est une opération délicate. Nous croyons avoir beaucoup plus de garanties en nous tenant au dosage des chlorures selon VOLHARDT qui est un type de dosage chimique; et la saponification préalable du chloroforme a été dûment établie par NICLOUX, dans chacun de ses détails.

Nous compterons le chloroforme dans l'atmosphère selon la formule de l'école francaise en grammes par 100 litres d'air. Nous nous demandons en vain quel avantage KOCHMANN et son école trouvent à diviser ce facteur par 5 à chaque opération pour donner un volume % qu'on ne titre jamais.

CHLOROFORME ANORMAL.

NICLOUX constate, avec étonnement semble-t-il, que les analyses de contrôle de chloroforme lui donnent un déficit régulier de 2 %.

Quand nous avons commencé nos dosages, et fait les contrôles avec des volumes connus de chloroforme, nous avons eu une surprise autrement importante.

Un chloroforme de droguerie, datant d'avant guerre, ne nous livrait que le chlore correspondant à 13,2 ou 13,1, alors que la formule devait nous donner 15 et cela dans les conditions les plus simples d'anlyse : 5 cc. de chloroforme dissout dans 100 cc. d'éther, et prise de 5 cc. du mélange, saponification selon NICLOUX et dosage VOLHARDT. Nous demandons alors du nouveau chloroforme que nous livre une pharmacie du bureau de bienfaisance et celui-ci ne nous donne qu'une proportion de 11,3 et 11,2 au lieu de 15.

Très perplexe, nous cherchons un chloroforme d'une pharmacie de confiance et celui-là nous donne effectivement 14,9 à 15.

Curieux de connaître cette fraude (alcool? $CH^2 Cl_2$?), nous installons une distillation fractionnée du chloroforme de 11,3 avec déflegmateur et thermomètre : nous recueillons la 1re fraction isolément (1/4 environ de la masse employée); malgré que, dès le début, le thermomètre se mit à 61° et s'y maintint jusqu'à la dernière goutte, la première fraction fut soigneusement remise à distillation lente mais dès le début le thermomètre se fixa encore à 61°.

La portion principale, sans la première portion et sans la goutte finale, fut analysée pour son contenu en chlore et ce fut le même chiffre de 11,3 qui nous revint.

Il ne saurait donc être question, ni d'alcool, ni de CH_2Cl_2 ou CCl_4, à fortiori de CH_3Cl.

Ces chloroformes étaient corrects comme t° de distillation et densité. Il faudrait connaître les méthodes de fabrication employées, pour indiquer une piste au chercheur.

On voit aussi combien une recherche scientifique sur le chloroforme présente d'écueils, si même la drogue, malgré les rigueurs de la pharmacopée, présente de pareilles variantes.

Nous constatons le fait, nous n'avions pas le temps de pousser plus loin nos investigations de ce côté.

Evidement, nous n'avons employé que du bon chloroforme.

CHLOROFORME DANS LE SANG.

Nous avons fait nos expériences sur des lapins indigènes, animaux beaucoup plus indifférents aux petites opérations que les chiens, et plus comparables entre eux quant à la taille et à la race. Cela ne nous a pas empêché de trouver des idiosyncrasies pour le chloroforme, sur une petite proportion d'animaux d'apparence ordinaire, question que nous traitons ailleurs et qui fut le point de départ de ce travail.

Dès 1884 KRONECKER avait montré que la charge chloroformique nécessaire à l'atmosphère pour endormir le lapin est peu différente de lle du chien.

Ultérieurement CUSHNY, GEPPERT, ROSENFELD, MADELUNG et d'autres donnent généralement des chiffres un peu inférieurs ; il est vrai que CUSHNY tombe au 1/3, ROSENFELD aux 2/3 ; mais on peut fort suspecter leurs titrages.

RITSCHEL et STANGE, élèves de KOCHMANN, avec des méthodes beaucoup plus exactes, arrivent à une moyenne de 1,7 vol. % pour lapins, ce qui diffère à peine de celle de P. BERT pour chiens : 1,77 ; on voit que les cloches de P. BERT ont été difficiles à remplacer !

Quand nous entreprîmes les narcoses sur les lapins, nous ne doutions pas de trouver les doses narcotiques assez près de ces limites : n'applique-t-on pas constamment les chiffres de P. BERT et de NICLOUX à la narcose humaine ? Et les théories physiques de la narcose n'exigent-elles pas identité d'effet pour les systèmes nerveux les plus différents ? La théorie d'OVERTON saute des mammifères aux têtards de grenouilles et aux êtres monocellulaires même, avec une insouciance totale.

Aussi, nous ne fûmes pas étonné de voir nos lapins mis en cage fermée, s'endormir en 10 minutes quand nous y versions environs 8 à 10 grammes de chloroforme pour 100 litres (sauf de rares exceptions) : pour la dose de 6 à 7 gr. ils restaient presque sans symptômes apparents, ni crise d'agitation, ni décubitus à l'abandon. Nous savons aujourd'hui que ce n'est là qu'une coïncidence : les souris blanches trouvent leur dose limite encore dangereuse *au cinquième* de la dose nécessaire au lapin.

Pareil fait montre qu'il faut être prudent dans l'application des données d'une espèce à l'autre, et que les théories physiques auraient bien du mal à expliquer ces divergences.

Confiants dans la théorie généralisante, nous fûmes d'autant plus étonné aux premiers dosages du chloroforme dans le sang de lapin, de ne trouver que des chiffres de moitié inférieurs à ceux du chien.

Nous jugeons la narcose parfaite quand l'animal ne réagit plus aux fortes douleurs : une lésion facile à provoquer toujours semblable est l'écrasement des tissus de l'oreille entre les mors d'une forte pince canelée : il faut appliquer la pince en plein milieu du pavillon. (l'extrémité de l'oreille est infidèle). Alors l'animal se laisserait faire n'importe quelle entaille sans réagir.

Expériences I. — Lapin de 2 kil.

Trachéotomie, une canule dans la carotide. L'animal est mis sur le circuit cage-pompe. La cage reçoit une charge de 9 gr. pour 100 l.

Après 15 minutes, l'animal ne réagit plus à l'écrasement de l'oreille.

Saignée carotidienne de 33,2 gr.

Dosage du chloroforme 18 mill. pour 100 gr. de sang.

II. Lapin de 2,2 kil., mêmes disposition et atmosphère.

L'animal respire indépendamment du moteur durant 10 min., puis il devient isochrone.

A la 14e minute saignée carotidienne de 48,8 gr.

Dosage du chlorof. : 19,4 mill. pour 100 gr.

III. Lapin de 2 kil., mêmes disposition et charge.

L'animal conserve son rythme respiratoire propre durant tout le temps.

Saignée de 26,78 gr. à la 12e min.

Dosage du chlorof. : 22,1 mg. %.

IV. Lapin de 2,5, même disposition.

Saignée de 32 gr. en bonne anesthésie à la 14e minute.

Dosage du chlorof. : 25,2 mg. %.

Nous verrons que ces chiffres en profonde anesthésie peuvent être parfois plus élevés, nous trouverons une fois pour la carotide le chiffre de 33,2 mgr. % et une fois 37,6 mg. %.

Remarquons que 20 à 30 milligr. % est aussi la dose donnée par NICLOUX dans le sang de l'unique chèvre examinée à ce point de vue.

C'est à ce moment que, nous défiant de nos analyses, nous refîmes des contrôles de toutes les étapes de la méthode sans lui trouver de défauts. Il fallait donc adopter nos chiffres comme réels.

Notre étonnement grandit encore quand un lapin qui exigeait, pour dormir, une dose de 50 % de chloroforme au-dessus de la normale, (fait dûment contrôlé) nous présenta dans le sang 16,5 mg. %, le taux le plus bas que nous ayions rencontré. Il y a là une divergence pour laquelle nous n'oserions ébaucher aucune interprétation actuellement. C'est à ce moment que nous décidions de prendre la tension de vapeur du chloroforme dans le sang.

TENSION DE VAPEUR DE CHLOROFORME DANS LE SANG

Ce fait et d'autres (la différence entre les taux du lapin et du chien, le fait affirmé par NICLOUX que le plasma ne contient que 12 % du chloroforme retenu par le sang) et toutes les hypothèses possibles sur la charge lipoïdique variable des divers sangs, nous démontraient l'urgence de déterminer la pression de vapeur du chloroforme sanguin.

Et pour cela, aucun calcul ne nous renseigne; il faut déterminer expérimentalement quelle atmosphère est en équilibre de tension avec le sang circulant dans le poumon.

Notre but était donc de mettre l'animal en pleine narcose en rapport avec une atmosphère très restreinte, dans laquelle il exhalerait son chloroforme jusqu'à ce que ce gaz soit en équilibre de tension avec celui du sang.

Pour un animal de 2 à 3 kilos, le volume dans lequel l'animal exhalera son chloroforme devra être aussi petit que possible ; la perte que l'organisme subit en chargeant l'atmosphère doit être aussi petite que possible. Mais pour l'analyse du chloroforme de cette atmosphère il nous faut au moins 300 cc. Pour bien charger cette

atmosphère, il faut que cet air passe plusieurs fois dans le poumon. Nous le ferons donc respirer 5 minutes : en ce temps, il aura exhalé et inhalé plusieurs fois ce volume.

Mais il ne faut pas que cela entraîne ni surcharge de CO_2, ni insuffisance d'oxygène. L'absorption de CO_2 doit être énergique : des soupapes à eau chargée de soude caustique même à 30 % laissaient encore se produire une respiration asphyxique. Un tube de 30 centimètres (diamètre de 1 cm.) muni de bâtons de potasse caustique sur le trajet de l'air nous délivra de tout symptôme asphyxique.

L'absorption de l'oxygène à raison de 6 cc. par minute et par kilog. enlèverait par minute $15 \times 5 = 75$ cc. En 2 minutes donc l'O de l'atmosphère de 300 cc. tomberait dans les zones nuisibles. Il fallut donc charger l'appareil d'oxygène pur. Enfin l'atmosphère présentée devait se réduire au moins du volume de CO_2 exhalé et fixé par la potasse, d'où la nécessité d'intercaler un ballon de 100 cc. environ, ballon qui sera totalement affaissé à la fin de l'expérience.

Ce ballon à parois molles (qui ne peut pas être en caoutchouc) permet de suivre les changements de volume imprimés par la respiration : sans cela, tout le système à parois rigides s'opposerait néfastement à l'expiration comme à l'inspiration.

Bouchons en liége, soupapes en verre ou à eau sans résistance ; les 2 cc. d'eau de ces soupapes pouvaient se mettre en équilibre chloroformique sans troubler les résultats : la durée de l'expérience étant surabondamment longue.

L'appareil était donc finalement constitué comme suit, après une série d'essais ;

L'air exhalé est obligé de suivre la direction donnée par les soupapes, même si elles ne sont pas contigües à la trachée.

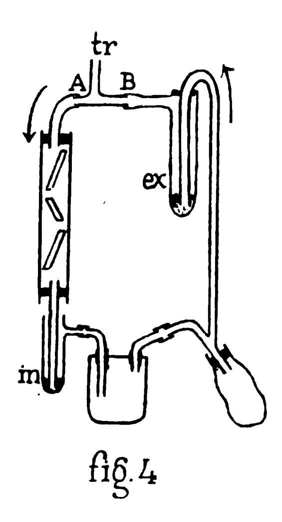


fig. 4

Nous le dirigeons donc comme suit : Voir fig. 4.

1° il passe sur les bâtons de KOH solide, sur une longueur de 30 cm. Pour nous mettre à l'abri d'une destruction de chloroforme (analogue à celle exercée par la soude alcoolique à chaud) nous avons dosé les chlorures attachés à ces bâtons après un ensemble de passages équivalents à plus d'une heure.

Or, ce n'était que quelques milligr. Le chloroforme perdu de ce chef ne saurait donc décharger l'organisme, ni abaisser le taux de l'atmosphère que nous allons doser.

2° l'air passe ensuite par la soupape à eau d'exspiration. Nous, avions d'abord essayé des soupapes en verre mais elles perdent rapidement leur mobilité par les vapeurs d'eau. Nous ne plaçons plus cette soupape immédiatement contre la trachée, comme on le fait instinctivement, parce que, dans les moments d'agitation, l'animal fait parfois remonter l'eau jusqu'à sa trachée et alors l'agitation et le trouble ne font que redoubler et forcent souvent de couper toute l'expérience.

A ce niveau, l'eau de la soupape, en remontant, ne peut qu'aller balayer transitoirement quelques bâtons de soude, ce qui est sans suites.

3° de là, l'air pénètre dans le vase de 300 cc. et est dirigé par le tube d'arrivée au fond du vase, alors que le tube de sortie aboutit en haut du côté opposé : petite précaution pour avoir le meilleur mélange des gaz.

4° de là, l'air passe devant la bifurcation qui mène au ballon à parois flexibles, qui est placé de façon qu'une rentrée d'eau de la soupape d'inspiration coulera directement dans ce ballon flexible et ne souillera pas le vase de 300 cc. Ce ballon flexible ne peut pas être en caoutchouc, nous avons employé une petite vessie de porc. L'essai primitif d'un flotteur équilibré présentait de multiples désavantages.

5° L'air arrive finalement à la soupape d'inspiration, *ex*, qui peut sans aucun inconvénient se trouver contre la trachée.

Tous les joints sont établis par des bouchons neufs et bouillis, traversés par les tubes en verre. Il n'y a que les deux joints de la trachée avec l'appareil et les deux joints qui relient le vase de 300 cc. qui exigent des tubes en caoutchouc. Mais nous soignons pour que les tubes de verre ou de métal qu'ils unissent soient directement en contact l'un avec l'autre, même on choisit les dimensions des tubes de manière que l'un rentre légèrement dans l'autre; de sorte que les 3 ou 4 millimètres de tubes caoutchoutés (pour tout l'appareil) qui sont en contact avec l'atmosphère intérieure ne sont pas même sur le courant des gaz.

Les deux joints de la trachée ne sauraient influencer l'analyse. Les pertes au niveau des 2 autres joints ne sont pas dosables et sont inférieures aux erreurs du dosage du chlore.

L'appareil ainsi installé fonctionne avec une aisance et une régularité parfaite. Le ballon flexible, tout en se vidant peu à peu, suit chaque mouvement respiratoire avec docilité ; les soupapes ne subissent aucun soubresaut, même dans les légères agitations, l'animal ne paraît d'ailleurs subir la moindre gêne respiratoire.

Il faut évidemment que l'air soit remplacé par de l'oxygène.

Avant chaque expérience, un canon d'oxygène liquide est mis en rapport avec le tube qui touchera la trachée en A ; il traverse tout l'appareil; remplit et distend légèrement le ballon flexible et ressort par le tube qui se trouvera au niveau B. La soupape *in* règle automatiquement la pression intérieure, la soupape *ex* empêche l'air de pénétrer en attendant l'expérience.

On laisse passer ainsi 10 à 20 litres d'oxygène ; au niveau B, une allumette en ignition se rallume instantanément. L'appareil est prêt à être relié à la trachée en commençant par le joint A, puis le joint B.

Pour le cas où nous voulions prolonger l'expérience, nous avions adapté à la vessie mobile un second tube par lequel nous pouvions à tout moment rendre une centaine de cc. d'oxygène pur dès que la vessie était totalement affaisée.

Expérience : Lapin de 2,100 kilos.

Trachéotomie, canule à 2 branches ; canule dans la jugulaire, bout périphérique.

Administration du chloroforme sur tampon d'ouate, présenté devant la canule trachéale, jusqu'à disparition de la sensibilité et du réflexe cornéen, obtenue en 10 minutes environ.

Alors, on branche l'appareil sur la canule trachéale. L'animal a fait quelques respirations durant cette manœuvre et a vidé ses grosses voies aériennes de l'atmosphère non utilisée par le poumon.

L'animal respire 5 minutes à l'appareil. Puis celui-ci est détaché et on continue à entretenir la narcose au tampon tandis que le vase de 300 cc. est détaché sans permettre une sortie d'air, et un nouveau vase de la même dimension est intercalé Tout l'appareil est rechargé d'oxygène et est prêt pour une seconde prise. L'animal, toujours en narcose depuis 10 minutes environ, est remis en contact avec l'appareil durant 5 minutes. A ce moment, une saignée de 31,7 g. est reçue de la jugulaire dans un flacon d'alcool.

Résultats :

1er échantillon d'air : l'atmosphère recueillie contient le correspondant de 2,4 gr. de chloroforme pour 100 litres.

2e échantillon : 2,7 gr. pour 100.

Sang de la jugulaire : 34 millig. pour 100 gr. de sang.

L'erreur d'analyse peut atteindre 2 % pour chacune de ces analyses.

Expérience de contrôle :

Le premier animal était dans une narcose profonde obtenue en 10 minutes. On peut croire qu'il avait reçu des doses assez fortes à

inhaler. Il y avait intérêt à chloroformer avec une atmosphère titrée.

De plus, nous défiant malgré tout de la suffisance de temps laissé à l'animal pour équilibrer de façon stable l'atmosphère de l'appareil, nous faisons l'expérience en sens inverse : c'est-à-dire que lorsque l'atmosphère oxygénée est prête, nous injectons dans le vase de 300 cc., par une seringue de PRAVAZ piquée à travers un des joints, 1.3 cc. d'une solution d'éther contenant 1 % de chloroforme en volume. Ce qui correspond à 6 gr. de chloroforme pour 100 litres. Cette introduction entraîne du gonflement supplémentaire de la vessie molle et un léger départ d'air par la soupape d'expiration ; une partie de cet air n'est sûrement que de l'air non chloroformé, déplacé dans la tuyauterie : la partie de chloroforme qui pourrait avoir quitté l'appareil, à en juger par le calcul du volume que prend 1 cc. 3 d'éther, ne pourrait jamais atteindre la moitié du chloroforme injecté dans les circonstances les plus défavorables.

Animal de 2.3 kilos : Trachéotomie ; l'animal est placé dans notre cage hermétique de 75 litres avec une charge d'environ 8 gr. de chloroforme pour 100 litres.

Il faut 20 minutes pour atteindre l'anesthésie. Il est alors retiré rapidement de la cage, jeté sur la table devant l'appareil et mis en rapport avec lui, sans perdre de temps à lier l'animal, ce qui était d'ailleurs superflu.

Respiration dans l'appareil durant 3 minutes.

Résultats : l'air du ballon ne contenait plus que l'équivalent de 2 gr. 3 pour 100 litres.

Une expérience où l'animal était insuffisamment narcotisé nous avait donné 1,4 gr. %.

Conclusion :

Ces expériences se confirment catégoriquement l'une l'autre; l'atmosphère chargée d'O pur a atteint en 5 minutes 2,4 et 2,7 et l'atmosphère chargée au delà de 3, probablement au delà de 4, est descendue en 3 minutes à 2,3. C'est évidemment l'équilibre de pression avec le sang veineux que nous réalisons ici ; comme l'expérience dure 5 minutes et que NICLOUX a montré que le taux sanguin baisse de moitié en 1 minute si on laisse respirer à l'air libre, il n'était pas possible de prévoir quel serait l'abaissement pour le lapin respirant en vase clos. Le dosage de chloroforme dans le sang était donc nécessaire.

Comme nous avons saigné après l'exhalation, le chiffre de 34 milligr. pour 100 gr. de sang est sûrement un minimum : la narcose était profonde. Il fallait cette vérification pour autoriser la conclusion.

D'une part donc, une tension correspondante à 2,7 gr. de chloroforme sur 100 litres se trouve réalisée pour un sang qui a 34 milligr. pour 100 gr. au minimum ; d'autre part, une pression de 2,3 % au maximum fait suite immédiate à une inhalation d'une atmosphère qui était à 8 g. % chloroforme.

La vérité ne saurait pas être loin de cette thèse « que, chez le lapin, la tension de vapeur de chloroforme dans le sang atteint à peine le quart de la tension de vapeur de l'atmosphère dans laquelle l'animal est plongé. »

Il y a donc une disproportion énorme entre le taux chloroformique du sang et le taux qu'il atteindrait s'il était saturé par l'atmosphère présentée à l'animal.

SERUM ET GLOBULES IN VITRO.

POHL en laissant sédimenter du sang estime que les globules fixent deux à quatre fois plus de chloroforme que le plasma. NICLOUX reprend cette question, en centrifugeant du sang d'animal narcotisé, et il arrive à conclure que 88 % du chloroforme est fixé sur les globules et seulement 12 % sur le plasma : les globules retiennent 7 à 8 fois plus de chloroforme que le plasma. Cette thèse est renversante, et son explication échappe à toute interprétation.

Elle est peut-être brillante pour ceux qui croient que les globules sont chargés de lipoïdes ; mais c'est là une grosse erreur. O. DEMEES, au laboratoire de Louvain, a retiré les lipoïdes des globules rouges soupçonnés antérieurement de constituer la substance lysinogène, et il constate que les globules rouges ne contiennent que des quantités extrêmement faibles de substances solubles dans l'éther.

On se demande donc quelle substance fixerait le chloroforme dans le globule.

Serait-ce parce que c'est une cellule en vie? mais les cellules vivantes se défendent plutôt contre les agents nocifs; elles ont, pour beaucoup de principes toxiques, des moyens de résistance dans leur structure de surface.

Enfin, dans cette thèse, le taux du chloroforme du plasma qui est en rapport le plus direct avec l'atmosphère inhalée tomberait de ce chef même chez le chien à 6 et 8 % au lieu de 50 à 60 % et alors la tension de vapeur devrait être encore bien plus basse qu'elle n'est en réalité.

Nous craignons que la sédimentation de POHL et la centrifugation de NICLOUX ne soient des moyens erronés; ou bien, des dosages sont faits sur des quantités trop minimes : si nous comprenons bien les données de NICLOUX, il n'avait à sa disposition que 10 à 15 grammes de plasma et il n'y trouvait qu'un milligramme de chloroforme : nous savons par expérience combien des dosages comportant la distillation et la saponification sont dangereux à juger à ces taux de chloroforme.

Nous avons cru qu'il fallait agir autrement et que toute la question est à reprendre in vitro, d'abord.

Voici une première manière d'étudier la question.

Nous prenons une quantité suffisante de sang battu d'un animal normal pour en faire deux parts : une qu'on centrifugera pour en recueillir 20 à 30 centimètres cubes de sérum, et une qu'on emploiera comme telle. Voir fig. 5.

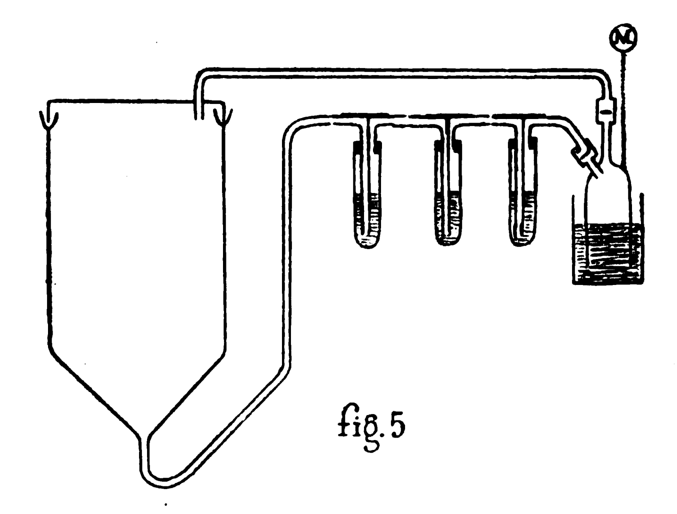


fig. 5

Du RINGER d'une part, du sérum ensuite et enfin du sang battu sont mis chacun en quantité suffisante dans des éprouvettes de dimensions telles que ces liquides forment une colonne haute de 5 à 7 centimètres : le tube amenant le gaz à faire barboter descend jusqu'au fond de l'éprouvette.

Ce système d'éprouvettes reliées l'une à la suite de l'autre est alors intercalé dans le circuit décrit plus haut à la place de l'animal trachéotomisé.

La cage hermétique étant chargée d'une quantité connue de chloroforme et la pompe mise en œuvre, les liquides des éprouvettes seront soumis à un barbotage énergique comportant le passage d'environ 3 litres de gaz par minute.

L'identité de l'atmosphère pour les 2 ou 3 tubes mis sur le même circuit ne saurait faire de doute, ce que le 1er tube absorbe ne saurait jouer un rôle.

Après 5 minutes la saturation en équilibre était certainement obtenue, car 10 minutes plus tard dans un contrôle sur Ringer seul nous obtenons le même chiffre qu'après 5 minutes.

Nos quantités analysées étaient grandes : 20 à 30 cc. par épreuve et vu la charge en chloroforme l'erreur d'analyse tombe sous le 1 %.

Et pourtant ces dosages comparatifs en série exigeant la distillation outre le saponification donnaient plus souvent des déchets expérimentaux qu'on ne le croit à priori.

Voici nos premiers résultats : il s'agit de sérum et de sang du même animal pour chaque série ; mais d'une série à l'autre la source sanguine et le % de l'atmosphère différaient.

I. Atmosphère de 8 gr. pour 100 litres.
Ringer 103,5 milligr. pour 100 grammes.
Sérum 101,8 » » »
Sang 111,2 » » »

II. Atmosphère de 8 gr. pour 100 litres.
Ringer 122,5 milligr. pour 100 grammes.
Sang 121,3 » » »

Sérum perdu.

Simples expériences d'orientation pour voir si oui ou non la question mérite d'être reprise.

Transitoirement, nous voyons que du sang saturé aux atmosphères narcotisantes prend encore plus de chloroforme que TISSOT n'en a obtenu dans sa seule expérience où il a secoué du sang durant 5/4 d'heure avec une atmosphère malheureusement mal déterminée.

En tout cas devant les lois physiques de la saturation par une atmosphère à tension donnée, la différence entre un Ringer, un sérum et du sang battu entier ne sera pas grande.

C'est beaucoup plus conforme aux prévisions théoriques et nous estimons que toute la question mérite d'être reprise d'abord aux tensions graduellement croissantes, depuis les plus faibles surtout.

Ensuite, en isolant chacun des facteurs qui pourraient intervenir dans le sang, et si alors le sang circulant se comporte encore autrement qu'in vitro, il faudra envisager les circonstances extrasanguines qui peuvent exercer une influence.

On a jeté trop vite cette notion de POHL et NICLOUX dans la série de faits acquis : elle prête à critique.

Elle est d'ailleurs accessoire dans notre hypothèse de travail.

EFFETS D'UN SEUL PASSAGE DU SANG A TRAVERS LE POUMON

Pouvons-nous préciser encore les données du problème devant lequel nous nous trouvons ?

Il nous semble que oui.

TISSOT attribue la divergence entre sang et atmosphère, à une divergence qui existerait entre l'atmosphère extérieure et l'atmosphère alvéolaire : il croit l'avoir prouvé par les résultats rapidement sidérants obtenus par sa polypnée violente qu'il réalise par les pressions rapides et fortes sur la poitrine de l'animal au point de décupler et plus le débit de la respiration. La seule expérience détaillée qu'il donne avec un graphique de la pression carotidienne nous fait penser que sa manœuvre est délétère et trompeuse et que même sans présenter le chloroforme il aurait obtenu un résultat analogue. Mais ce sont là de simples objections. Nous soupçonnons un autre facteur, qui inter-

vient probablement : c'est la brièveté du contact du sang des capillaires pulmonaires avec l'atmosphère alvéolaire.

Certes, pour l'oxygène, la durée d'un passage à travers les capillaires du poumon suffit pour faire passer un sang asphyxique, du violet noirâtre à l'état du sang rouge vermeil ; cela se voit à l'œil nu quand on asphyxie un animal qui a la carotide nue et qu'en pleine asphyxie on réinstalle la respiration artificielle ; 4 à 5 secondes après le premier coup de pompe la carotide passe du violet foncé au rouge tendre. Mais l'oxygène de l'air est à la tension d'un cinquième d'atmosphère tandis que le chloroforme n'est qu'au 1/50 d'atmosphère, première différence dans les facteurs ; de plus la diffusion du chloroforme à tension égale est probablement notablement plus lente.

Il est donc du plus haut intérêt pour la théorie, de connaître l'influence d'un seul passage du sang à travers le poumon.

Nous pouvons réaliser cela de deux façons :

1°) en voyant le résultat du premier contact du sang avec l'air chloroformé.

2°) quoique moins parfaitement, en déterminant la différence de charge entre le sang veineux et le sang artériel en pleine narcose.

Premier contact.

Ici l'expérience peut se réaliser de façon idéale.

Quand on commence une inhalation d'un gaz spécial, durant les 30 premières secondes, la durée minimale d'une révolution sanguine, tout le sang qui se présente au poumon vient pour la 1re fois en contact avec la nouvelle atmosphère gazeuse.

D'autre part l'atmosphère alvéolaire peut en peu de secondes être mise en équilibre approximatif avec l'air extérieur. Il suffit de provoquer une polypnée moyenne par une légère asphyxie préalable.

La différence de tension sera donc bientôt minimale entre le gaz alvéolaire et le sang qui le rencontre pour la première fois, c'est de la 20e à la 30e seconde que l'effet sera à son optimum.

Voici comment nous réalisons l'expérience avec toutes les garanties désirables.

Nous installons le grand circuit représenté en partie fig. 5, mais que nous avons modifié comme suit :

1°) cage de 75 litres hermétique conservant durant une heure s'il le faut le même taux de chloroforme aux analyses de contrôle. L'eau qui ferme la rigole dans laquelle tombe le couvercle est chargée préalablement de chloroforme à la même tension que l'atmosphère de la cage.

2°) Un circuit en tubes de verre sur lequel se trouve :

a) d'abord une pompe aspirante foulante constituée par une cloche en verre plongeant sur mercure : ses deux larges soupapes à paroi métallique ont des clapets en mica sans caoutchouc.

Un moteur électrique donne un soulèvement et abaissement par 5 secondes. Cela entretient dans le circuit une circulation très suffisante pour éviter toute accumulation de l'air expiratoire à n'importe quelle place.

b) L'animal trachéotomisé est installé sur ce circuit, et à proximité se trouve le ballon flexible sans lequel l'animal serait rapidement tué par l'aspiration violente que le jeu de la pompe exercerait sur ses poumons.

Une dose narcotisante est versée dans la cage sur une compresse de tulle pendue ; un large carton ventilateur mu à la main par une tige qui passe par la gouttière sert à uniformiser l'atmosphère.

(Dans nos premières expériences, l'air passant au niveau de la trachée et aspiré dans le bas de la cage, était parfois plus chargé que les prévisions le permettaient).

D'ailleurs ici nous aurons soin de prendre directement un échantillon de cet air à la fin de l'expérience, et cela par le système aspirateur décrit plus haut, page 35. Nous saurons ainsi exactement sous quelle tension, la vapeur de chloroforme a été présentée.

Avant d'installer l'animal sur le circuit, l'air chargé de la dose de chloroforme prévue a été entraîné par quelques coups de pompes à travers tout le système fermé sans animal ; et à la fin de cette manœuvre, le circuit est bouché de facon que la pompe, continuant de fonctionner, gonfle peu à peu le ballon flexible.

Tout est arrêté alors, l'animal trachéotomisé et portant une canule dans la carotide est placé sur le circuit ; mais à ce moment nous tenons la canule fermée, pour provoquer une légère asphyxie, durant 20 à 30 secondes.

A un instant précis le doigt asphyxiant est levé et la canule trachéale est placée dans le circuit ; un aide déclanche le moteur qui pompe, et commence à compter à haute voix les secondes.

Cette petite manœuvre ne prend qu'une seconde et durant les premières secondes de l'expérience l'animal fait de vives et rapides respirations, suite de l'asphyxie légère et intentionnelle.

Quand l'aide qui compte les secondes arrive à la 10e ou la 15e, la pince serre-fine de la carotide est pressée, le sang jaillit dans le vase taré avec sa charge d'alcool, et vers la 25e seconde ou 30e seconde la serre-fine est replacée.

L'aide continuant de compter à haute voix, une seconde prise de sang sera faite à la 100e ou 180e seconde.

Voici les resultats :

1) Animal de 2,2 kil.

Air respiré, dosage à la fin de l'expérience, 7 gr. %.

Chloroforme du sang de la 10e à la 30e seconde : 9 milligr. %.

Chloroforme du sang à la 180e seconde (3 minutes) 19,5 milligr. %.

Remarque :

Le premier dosage de sang se fit sur 36,6 gr. de sang.

Le second dosage de sang sur 21,7 gr.

La limite d'erreurs possibles est respectivement de 6 % et 5 %

2) Animal de 3,3 kil. :

Air respiré, dosé à la fin de l'expérience 7,4 gr. %

Chloroforme du sang de la 15e à la 25e seconde =14 milligr.

Chloroforme du sang à la 100o seconde = 18 milligr.

Limite d'erreurs possibles pour le dosage du sang 4 %.

Conclusion :

Dans la situation de légère asphyxie que nous avons provoquée, la vive respiration durant 10 à 15 secondes doit avoir mis l'air alvéolaire à peu de différence avec l'air du circuit. L'estimer seulement à la moitié de cette atmosphère est une large concession.

Tout le sang recueilli dans la saignée avait subi le contact de l'air chloroformé car il ne faut pas 5 secondes pour qu'il fasse le trajet du poumon à la carotide. A la 25e et même à la 30e seconde, aucune parcelle du sang analysé n'avait encore reçu de second contact avec le poumon. Or ce seul passage réalise 9 mill. et 14 mill. % soit la moitié de ce qu'on trouve pour une narcose suffisante. A la 100e seconde le sang est probablement dans son second tour ; la physiologie nous apprend que le circuit le plus court se fait en 28 à 30 secondes ; mais beaucoup de sang fait un plus long trajet et la moyenne peut s'estimer à une minute. Or durant la seconde minute, soit à la 100e seconde, le taux narcotisant est déjà à peu près atteint.

Après 3 minutes, il est certainement au taux suffisant.

A ce moment l'animal ne présente même pas encore le stade d'excitation qui ne survient chez le lapin qu'après 7 minutes dans les atmosphères titrées qui l'insensibiliseront en 10 à 12 minutes.

En tout cas, d'une façon absolue, le premier passage qui devrait apporter le plus grand écart ne réalise que 9 à 14 milligr. % de charge chloroformique.

Effet d'un contact en pleine narcose :

Ici nous préparons et installons l'animal comme ci-devant, sur le même appareil chargé de chloroforme. Seulement nous l'y laissons d'abord durant 8 à 10 minutes, pour le saigner alors que la respiration est encore vive : une respiration affaiblie nous donnerait des differences trop faibles.

Une canule se trouve dans le bout périphérique d'une jugulaire commune, l'autre jugulaire est liée. Une autre canule se trouve dans une carotide.

A un moment donné on ouvre la canule jugulaire pour recevoir son sang dans le récipient taré, et au moment où un aide finit cette saignée, on ouvre la carotide pour l'autre saignée.

NICLOUX et TISSOT nous donnent beaucoup de dosages comparés des sangs veineux et carotidiens du chien. Nous ne saurions pas juger de la valeur de leurs chiffres ; NICLOUX narcotisait ses animaux au cornet ou masque usuel, et il ne détaille pas les précautions qu'il a prises : or si l'inhalation a été suspendue ne fusse que depuis 5 secondes, ou si l'inhalation a pu varier d'intensité, la différence obtenue sera trop faible.

TISSOT dit que ses saignées se faisaient simultanément, c'est mieux ; mais ses atmosphères titrées ne présentent pas la moindre garantie, et ses résultats donnent des différences de la moitié moindre que celles de NICLOUX.

Nous pensons qu'il poussait la narcose un peu loin, et que la respiration était très affaiblie.

Inhalation uniforme et ininterrompue, et respiration encore énergique sont deux conditions indispensables à une bonne estimation.

1° expérience à la 8e minute.
Notre sang veineux nous donne 22,3 mill. %
Tandis que le sang carotidien 33,2 mill. %.
L'air présenté donne au dosage 7,03 gr. pour 100 lit.
Limites d'erreur : (pour 19,8 gr. de sang carot.) 3 %,
et (pour 20,6 gr. de sang veineux) 5 %.

II Lapin de 3 kil.
Saignées après 10 minutes de chloroformisation.
Le sang de la jugulaire donne 26,7 mgr. %.
Le sang de la carotide donne 37,6 mgr. %.
L'air presenté donne au dosage 7,86 gr. pour 100 litres.
Limites d'erreur : pour 19,45 gr. de sang veineux, 4 % et pour 33,45 gr. de sang artériel, 2 %.

III Dans une troisième expérience où la respiration était devenue défectueuse la différence était presque nulle.

20 mgr. pour le sang veineux et 21,5 pour le sang artériel.

Ces chiffres montrent que, de bonnes conditions respiratoires et en pleine période où l'atmosphère alvéolaire est depuis longtemps en équilibre approximatif avec l'atmosphère présentée, le sang peut puiser encore 11 mgr. environ par 100 cc. à son passage pulmonaire. Cette proportion est étonnamment proche de celle qui a pénétré lors du 1r contact.

ABSORPTION DU CHLOROFORME PAR LES TISSUS.

Nous ne nous occuperons pas de la théorie de la narcose ni du coefficient de partage si bruyamment inauguré par les partisans des lipoïdes.

Certes nous croyons qu'une substance comme le chloroforme doit être accaparée par les lipoïdes pour lesquels il est accessible et nous nous tiendrons à ce fait physique brutal.

Dès lors, on est en droit de présumer que la répartition du chloroforme dans l'organisme localisera celui-ci de préférence dans les tissus chargés de beaucoup de graisse, comme POHL l'a exprimé d'abord.

Or, il est trop facile d'affirmer que les dosages confirment la théorie, en ne prenant que quelques chiffres isolés de NICLOUX et en fermant les yeux sur tous les autres.

Nous pourrions affirmer plutôt que NICLOUX a prouvé l'inanité de cette thèse.

En effet dans son grand tableau page 34 concernant ce sujet, nous voyons que le sang qui est le milieu le plus maigre est toujours le plus chargé de chloroforme à peu d'exceptions près ; ni foie, ni rate, ni rein, ni cœur, ni muscles n'atteignent de loin la charge du sang.

Et ici il y a des chiffres dont le rapprochement étonne : un muscle après 30 minutes de narcose donne 59 alors que d'autres muscles donnent 21,5 après 30 minutes de narcose et 24,5 seulement après 80 minutes de narcose : le tiers du sang, qui a 70 et 64 mg. chez le chien.

Et les tissus gras où on croirait trouver du chloroforme en abondance donnent des chiffres de 37,1, 26,5, 68, 68,5, 87 et 132 et cela pour des narcoses de 80 à 84 minutes. Il est facile d'invoquer la circulation insuffisante de certains tissus.

A son dernier chapitre NICLOUX reprend cette question à part pour les tissus nerveux et certainement ces expériences ont été plus soigneusement faites.

De plus ici, NICLOUX, aidé de Mlle FRISON, nous donne en même temps le pourcentage de la graisse des tissus qu'il examine et cette charge s'échelonne entre 8 et 16 pour cent du tissu frais. On croirait devoir trouver ici une localisation énorme de chloroforme car une insuffisance de circulation ne saurait plus être incriminée ; ce tissu se trouve en contact intime avec le sang artériel.

Or que voyons nous ici.

Rappelons que dans le tableau général de la page 34 où jusque 12 tissus sont analysés à la fois et qui ne peut être qu'une expérience d'orientation, on trouve pour le bulbe et la moëlle des chiffres dépassant légèrement celui du sang artériel 83, 85, 79, 80, et 75 (chiffres constamment rapportés par les traités, comme triomphe de la théorie).

Or dans ses nouvelles expériences sur la matière nerveuse et après de très longues narcoses (dont 4 de 2 h. et plus) ces matières nerveuses ne présentent qu'une seule fois le chiffre 71, cinq fois 60 à 67, une fois 52, par contre huit fois 40 à 50 et 5 fois moins de 40 et ces plus bas chiffres s'appliquent à des tissus contenant à l'état frais au moins 8 % de matière grasse (soluble dans le chloroforme).

La seule conclusion prudente qu'on devrait tirer de ces faits c'est

que l'affinité du chloroforme pour les lipoïdes ne trouve pas l'occasion de s'exercer dans ces tissus. Disons que cette question n'est pas tirée au clair.

L'expérience unique sur le lait de chèvre de NICLOUX nous parait plus intéressant : le chloroforme du sang se maintient au taux de 20 à 30 millg. mais celui du lait monte graduellement jusque 60 en une heure et demie, et la décharge du lait est aussi graduelle de 42 à 9 en 3 heures : ces chiffres restant tout le temps au dessus de ceux du sang.

C'est extrêmement intéressant et conforme à la théorie. Malheureusement il s'agit de lait et non d'un tissu en contact intime avec le sang.

Nous avons envisagé ce problème, d'une autre façon.

Nous voulons savoir d'abord non pas ce que retient tel ou tel tissu, mais ce que l'animal tout entier est capable d'absorber. Et ce qui nous intéressait surtout était de voir si, la narcose établie, l'absorption de chloroforme continue en proportions notables.

L'idée de prendre des échantillons de tissus à différentes périodes n'était pas réalisable et après les dosages de NICLOUX ne promettait aucun renseignement utilisable.

Nous résolûmes de déterminer ce que l'animal absorbe en dosant ce qu'il soustrait à une atmosphère fermée et bien dosée.

C'est pour ces expériences que nous avons reduit les analyses à leur plus grande simplicité, fig. 2, car il ne fallait pas courir les risques de causes troublantes multiples.

Un animal le plus grand possible était mis dans la cage de 75 l.; la rigole qui reçoit le couvercle était remplie d'eau contenant 0,7 cc., de chloroforme par litre (dose en équilibre de tension avec l'atm. intérieure).

Il fallait doser exactement la charge en chloroforme de cette cage, d'abord au moment où l'animal était affalé et puis 40 ou 60 minutes plus tard.

Pour chaque analyse 300 cc. d'air étaient aspirés directement dans le barboteur à alcool (voir page 35).

Une expérience préalable à vide sur l'absence de pertes dosables de notre cage, durant un temps double, nous donne toute garantie.

Chargée vers 4.30 h. le dosage d'un échantillon de l'air nous donne

à 4.50 h. 6,64 gr. pour 100 litres;
à 5.50 h. 6,7 gr. »
et à 6.50 h. 6,7 gr. »

Nous pouvons donc y placer un animal et suivre la baisse éventuelle du taux de son atmosphère.

I. Lapin de 2 k. est mis avec le chloroforme dans la cage, réduite à 50 l.; après 10 min. l'animal s'agite encore; à ce moment on prend le

premier échantillon d'air qui nous montre une teneur de 6,86 % ; donc le contenu réel des 50 lit. est de 3.43 gr. de chloroforme.

Après 15 min. la narcose paraît complète, et l'animal est affalé sur le flanc. Après 20 minutes de narcose, il agite assez vivement ses pattes, à la 50e minute il cherche à se remettre sur ses pattes mais n'y parvient pas ; ensuite il s'affaisse à nouveau dans l'abattement complet. Nous avions espéré le voir sortir manifestement de la narcose parce qu'il devait avoir détitré notablement le chloroforme de sa cage. Mais ce détitrage n'était pas suffisant.

Après cette heure, le dosage de l'air qui reste nous donne 5 gr. pour 100 litres soit en poids absolu 2,50 gr.

Absorption 0.93 gr. pendant 60' : animal de 2 kil.

II. — Lapin de 2 kil., cage de 75 litres.

1r dosage au début de la narcose 7,22 gr. %.	
valeur absolue par cage.	5.41 gr.
2e dosage : 40' plus tard 6,64 gr. % val. abs . . .	4.98 gr.
en 40' l'animal de 2.2 kil. absorbe	0,43 gr.

III. — Lapin de 3,2 k., cage de 75 litres.

dosage au début de la narcose. . .	6.93 %	5.1975
» 40' plus tard	5.87 %	4.4025
Absorption :		0,795

IV. — Pour répondre à une hypothèse de Nicloux nous dosons ici l'absorption qui se fait encore après 40'

Lapin de 2,0 kil. cage de 75 l.

dosage à la 40'	4,6 gr. %	3.45
» 30' plus tard	3.93 %	2,94
Un lapin de 2 kil. de la 40e' à la 70e' absorbe		0,51

Chose curieuse ce lapin était fort narcotisé à cette dose et est mort peu d'heures après sa 1re narcose.

Absorption par kil. et par minute :

I $\frac{0.93}{2 \times 60}$: de la 10e' à la 70e' = 7,75 mgr.

II $\frac{0.43}{2.2 \times 40}$: de la 10e' à la 50e' = 4,88 mgr.

III $\frac{0.795}{3.2 \times 40}$: de la 10e' à la 50e' = 6,21 mgr.

IV $\frac{0.51}{2 \times 30}$: de la 40e' à la 70e' = 8,5 mgr.

Il ne saurait y avoir de doute, l'organisme de l'animal narcotisé continue d'absorber du chloroforme et de l'emmagasiner.

Et les doses qu'il retient en moyenne en une heure par kil. seraient de :

I	0,465
II	0,2928
III	0,3726
IV	0,51

Rien ne fait prévoir une diminution d'absorption durant la 2e heure de la narcose.

Ce chloroforme ne se trouve sûrement pas dans le sang qui n'en contient pas 0,030 par kilogr. d'animal ou par 75 gr. de sang. Il ne se trouve pas non plus dans le cerveau d'après NICLOUX ; le taux de 0,060 pour 100 gr. n'étant pas fort soumis à variation. Il doit donc s'accumuler ailleurs.

Mais sont-ce là des doses si élevées ? Remarquons que ce n'est encore pour une heure que 0,050 par 100 gr. de tissu animal. (0,51 par kilo).

Si le muscle, le cerveau, le rein, le foie et la rate irrigués par le sang se mettent en équilibre avec lui; il n'y a pas un grand excédant de chloroforme disponible pour les tissus graisseux. Ceux-ci seraient bien capables d'en lier beaucoup plus, mais ils n'ont pas l'occassion d'en prendre, les quantités offertes sont trop petites.

Et ici il y a un rapprochement bien remarquable à faire : l'absorption des tissus est égale à l'introduction pulmonaire de chloroforme.

En effet, le sang carotidien dans de nombreuses analyses de NICLOUX, de TISSOT et dans les nôtres, contient 5 à 10 milligr. de chloroforme en plus par 100 gr. que le sang veineux. En comptant qu'un animal d'un kilo contient 75 gr. de sang et que ce sang fait le tour du corps en 1 minute, ce sera 4 à 7,5 mill. de chloroforme arraché au sang par minute : ce qui correspond parfaitement à l'absorption que nous avons trouvée pour l'animal entier.

Il est très probable que cette absorption est très inégale d'après le tissu que le sang traverse. Il est probable que les régions peu ou pas lipoidiques cessent rapidement d'absorber, tandis que le sang veineux sortant d'un réseau graisseux est peut-être beaucoup plus pauvre en chloroforme.

Le sang veineux que nous dosons est un mélange des différents sangs, c'est une moyenne ; même, en recueillant le sang du bout céphalique de la jugulaire, ce sang est un mélange de sangs revenant de tissus variés.

Il y a là une expérience à faire sur de grands animaux.

ÉLIMINATION DU CHLOROFORME APRES NARCOSE

NICLOUX a montré que chez le chien narcotisé et remis à l'air libre, le taux du chloroforme dans le sang tombe rapidement (en 2')

à un taux d'à peu près la moitié de sa valeur, mais alors ce taux se maintient assez longtemps (p. 32 : narcose de 89').

P. ex. à	0'	après la narcose	égale	54 mg. %
	1'	»	»	35
	2'	»	»	29
	5'	»	»	25,5
	15'	»	»	20,5
	30'	»	»	18
	60'	»	»	13

Les 2 premières minutes influencent plus la proportion que les 30 minutes suivantes.

Cela semble indiquer que le chloroforme des tissus parvient à équilibrer la perte pulmonaire ; car il n'est pas possible d'admettre qu'un sang contenant 25,5 mg. de chloroforme à la 5ᵉ minute ne perdra durant les 10' suivantes que ½ mill. pour 100 gr. de sang par minute ou par traversée pulmonaire. Nous avons vu que la pénétration pulmonaire pouvait en un seul contact amener au sang jusque 14 mg. % sans devoir atteindre ce chiffre, la tension de vapeur étant 4 ou 5 fois moindre. le chiffre de l'élimination ne saurait être réduit si bas.

Il n'y a qu'une manière de le savoir. C'est de faire en sens inverse l'expérience telle que nous l'avons pratiquée pour l'absorption.

Mais ici nous devons nous attendre à des quantités beaucoup moindres et pour ne pas avoir trop d'erreurs nous devons réduire nos installations.

Nous employons la cloche en verre de 20 litres fig. 3 que nous installons sur un plateau présentant une rigole remplie d'eau. A travers le fonds du plateau passe un tube en verre qui ira recueillir l'air que nous aspirerons à travers le chloroforme par le système décrit page 35. Nous ne pouvons aspirer plus de 300 cc. d'air car nous voyons déjà à la fin la pression négative de notre rigole laisser entrer quelques bulles d'air sous le bord de la cloche.

Il y a juste la place nécessaire pour coucher l'animal narcotisé sur le plateau. L'expérience ne peut pas durer plus de 20', sinon l'animal de 2 k. commencerait à surcharger l'air de CO_2. D'autre part si on absorbait ces 12×20 ou 240 cc. de CO_2, on arriverait à mettre la cloche à la limite de la pression négative.

Pour prolonger l'expérience, il faudrait prendre des dispositions supplémentaires.

Nous devons négliger les traces de chloroforme que l'eau de la rigole absorbera; mais son volume (200 cc.), la surface exposée à l'air intérieur (env. 100 cm^2) et la faible tension de chloroforme même à la fin de l'expérience rassurent amplement ; nous avions exposé dans la cloche de l'eau sur une surface triple durant une heure, sous une pression décuple et n'y avons trouvé que 10 millig. de chloroforme. L'erreur de ce chef sera donc d'un milligramme environ.

Exp. I. — Lapin de 2,2 k. narcotisé depuis 40 minutes, à dose faible de 4 gr. %. Il est affalé sur le flanc. On le retire de la grande cage où il se narcotisait et on le jette sur le plateau sous la cloche de 20litres.

Dosage de l'air après 20' : 0,40 % soit pour 20 litres, 80 mill. exhalé. Erreur possible de 20 %.

II. — Animal de 2,2 k. narcotisé depuis 1 heure à 6,8 gr. %, exhalé après 20 minutes : 120 mg. ; erreur possible de 10 %.

L'exhalation est donc moins rapide que l'absorption par kil. et par minute.

$$\text{I} \qquad \frac{80}{2,2 \times 20} = 1,8 \text{ mgr.}$$

$$\text{II} \qquad \frac{120}{2,2 \times 20} = 2,7 \text{ mgr.}$$

A ce taux l'élimination devra durer au moins 2 fois aussi longtemps que la narcose qui l'a précédée et cela correspond assez bien aux observations de NICLOUX relatées à la page 32 de son livre.

Il sera utile de poursuivre cette élimination absolue, durant un temps beaucoup plus long et après des narcoses de longueur et d'intensité variables.

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES.

Voici donc la suite de faits que nous rencontrons en réponse à notre hypothèse de travail.

Dans l'atmosphère inhalée, la tension de vapeur du chloroforme étant égal à 1, la tension dans le sang carotidien n'est que au tiers ou au quart de 1. Ce fait est brutal et demande une explication.

Cette différence s'explique-t-elle par une insuffisance d'aération pulmonaire ? comme TISSOT a l'air de le croire ; en d'autres mots : y a-t-il une pareille différence entre l'atmosphère extérieure présentée et celle des alvéoles ?

Ici il ne s'agit que d'un mélange mécanique entre l'air alvéolaire et l'air extérieur produit par la ventilation respiratoire. Dès lors les règles sont communes à tous les gaz de l'atmosphère, et si pour l'oxygène le mélange alvéolaire n'est pas loin de la composition atmosphérique quand la respiration est normale, nous ne pouvons pas admettre pour un autre gaz qu'il y ait une plus grande divergence entre ces deux atmosphères, sauf durant les premières secondes d'une inhalation.

D'ailleurs TISSOT, après avoir tant insisté sur les vives polypnées, admet quelques pages plus loin qu'il faut chercher la cause du déséquilibre dans les tissus. Il dit (p. 420) :

« Ce n'est pas le titre du mélange anesthésique qui importe le plus,

mais le titre de la vapeur de chloroforme dans l'alvéole pulmonaire, titre dont la valeur est réglée par l'intensité de la ventilation pulmonaire. C'est de ce dernier facteur que dépend la vitesse de pénétration du chloroforme dans le sang.

Si la proportion de chloroforme contenue dans le sang artériel ne dépendait que de cette pénétration, l'équilibre entre le sang et le mélange anesthésique serait vite atteint ; mais cette proportion dépend en outre d'un 2e facteur qui est la diffusion du chloroforme du sang dans les tissus. »

Ou bien la première phrase est une vérité à la Palisse, ou bien elle cache une conception erronée ; le titre de l'air alvéolaire ne saurait être fort différent du titre de l'air extérieur ; en respiration calme, une différence de 20 à 30 % est admissible et une polypnée un peu intense (inutile de décupler le débit respiratoire) réduit rapidement la différence à 5 % et moins. Après une petite période d'asphyxie, la polypnée qui en résulte durant une dizaine de secondes rétablit surabondamment l'équilibre avec léger excès même, car bientôt un peu d'apnée se manifestera. Tout cela est connu par les données élémentaires de la physiologie respiratoire.

Il faut donc admettre pour l'air alvéolaire une tension chloroformique de 2/3 au moins. On pourrait objecter qu'une absorption avide pourrait épuiser cette atmosphère au fur et à mesure de son entrée ; nous connaissons cette absorption par minute et par kilo ; elle est de 4 à 8 milligr. de chloroforme ; alors que le titre d'air en offre 80 à 100 milligr. au narcotisé. Il n'y a donc pas encore là d'explication.

La cause nous semble être tout autre, nous la saisissons sur le vif :

1° dans la charge minime que le sang prend par son passage unique à travers le poumon.

Notre saignée faite 15 à 25 secondes après le début d'une inhalation vive, provoquée par une légère asphyxie, nous présente du sang qui a été en contact avec l'air alvéolaire de la 10e à la 20e seconde. Or ce sang n'a pris que 14 milligr. de chloroforme, soit moins du 8e de ce qu'il aurait dû prendre pour atteindre l'équilibre avec l'atmosphère extérieure.

2°) dans la différence relativement faible qui existe entre le sang veineux et le sang carotidien à tous les stades de la narcose. Quoique le sang veineux n'ait que le tiers ou le quart de la tension de l'atmosphère inhalée, il ne prend au passage pulmonaire qu'un petit supplément représenté dans les chiffres de TISSOT par un dizième de sa charge artérielle.

	sang artériel	sang veineux.	différence.
page 421	53,2	48,1	5,1 sur 53,2
page 423	38,7	35,3	3,4 sur 38,7
page 423	43	38,8	4,2 sur 43

Les chiffres de NICLOUX ne sont peut-être pas comparables entre eux ; nous avons trouvé dans les meilleures conditions d'une vive respiration encore une différence de 11,33 mill. pour le sang carotidien et 22 pour le sang veineux, et une fois 37,6 pour le carotidien et 26,7 pour le sang veineux.

Au passage à travers le poumon, le sang prend en une fois une charge d'environ un 1/10 de ce qu'il pourrait prendre si le temps le lui permettait (pour TISSOT ce serait encore moins).

Il y a donc là un premier et réel facteur d'équilibre ; l'obstacle n'est pas dans la ventilation , il est dans la traversée de l'alvéole au sang. L'hypothèse la plus plausible est que les lois physiques, pour une tension de vapeur si faible que celle du chloroforme inhalé, ne permettent pas une diffusion suffisante durant le passage du sang à travers le réseau capillaire du poumon.

Il y a là un point de doctrine à établir encore par des expériences ou des calculs.

Le chloroforme est-il dans le sang partiellement lié à des lipoïdes ou aux globules rouges, et partiellement dissout? Nous pensons que dans le sang du chien, dont le taux chloroformé est double de celui d'une chèvre ou d'un lapin, il doit y avoir une partie liée ; l'herbivore a une alimentation beaucoup plus maigre que le chien ; nous avons essayé en vain de produire chez le lapin un sérum lipoïdique en donnant des graines oléagineuses, nous n'avons rien obtenu.

Quant à l'accaparement du chloroforme par le globule rouge selon POHL et selon NICLOUX, nous avons peine à y croire pour plusieurs raisons.

A) Si cet accaparement atteignait 88 % et si le sérum ne conservait que le reste, la tension de vapeur chloroformique serait chez l'animal encore beaucoup plus basse que nous ne la trouvons. Nous trouvons pour le lapin une tension équivalente à celle d'une atmosphère de 2,7 gr. de chloroforme pour 100 litres et cela pour un sang veineux donnant 34 mill. pour 100 gr. de sang. En comptant que le sérum à lui seul en équilibre avec l'atmosphère de 8 gr. de chloroforme prendrait 100 ou 110 mill., la tension et la charge en poids se correspondent suffisamment pour ne plus laisser aucun jeu à un accaparement par les globules, chez le lapin.

L'excédent chez le chien revient peut-être à des lipoïdes.

B) Quand on compare *in vitro* la capacité d'absorption du sérum et du sang du même animal pour des atmosphères narcotisantes, les différences tolèreraient à peine un accaparement de 10 %.

C) Nous ne trouvons aucune substance dans les globules qui serait capable d'absorber tant de chloroforme, la charge lipoïdique du globule étant minuscule.

La question est en litige. Nous pouvons la négliger, la tension de vapeur nous suffit d'ailleurs.

Que se passe-t-il enfin au passage du sang à travers les tissus?

Le sang y perd une partie de son chloroforme ; pour TISSOT 1/10, pour nous jusque 1/3 de sa charge moyenne d'ensemble, probablement la perte est-elle très variable d'après les tissus?

Les lois physiques des coefficients de partage exigent que l'eau chloroformée ou le sang chloroformé traversant un tissu chargé de graisse s'y dépouille vivement de presque tout son chloroforme.

Redoutant une surprise à ce point de vue, nous avons fait quelques épreuves *in vitro.*

a) Un sang chargé par barbotage d'une dose connue de chloroforme traverse une seule fois un tube en verre du calibre de 4 mm. et d'une longueur de 1,60 m., tube dont la paroi intérieure avait été légèrement recouverte de cire. Le sang passe à la température ambiante de 18°, il s'écoule goutte à goutte du tube légèrement incliné, il y a peut-être environ 20 secondes à la traversée, et il avait perdu les 9/10 de sa charge chloroformique.

b) 400 cc. d'eau distillée chargée de 46 mill. de chloroforme pour 100 cc. est mise dans un vase à décantation.

20 gr. d'huile d'olive préalablement nettoyée par un battage à l'eau distillée pure, est versée dans le même vase à décantation.

Le tout est secoué une seule fois durant 5 secondes, ce qui produit une émulsion grossière qui disparaît en peu de minutes, le vase est laissé en décantation et, celle-ci opérée, une analyse montre que le taux du chloroforme est tombé à 6 mill. pour 100 cc.

On le voit, le coefficient de partage agit vite et bien entre le chloroforme et les lipoïdes. Et les lipoïdes sont capables d'absorber bien plus que les 60 milligr. ou 100 milligr. pour 100 gr. de masse.

Une huile qui a reçu un grossier barbotage à grosses bulles de quelques litres d'une atmosphère narcotisante contient déjà 700 milligr. pour % dans un de nos essais.

Pourquoi la saturation des lipoïdes ne joue-t-elle pas dans le sujet chloroformé ? Parce qu'elle n'a pas l'occasion de jouer, selon toutes apparences.

Les tissus n'ont pris que 1/3 (nous) à 1/10 (TISSOT) du chloroforme qui leur est présenté parce que certains tissus sont rapidement saturés et ne prennent plus rien, tandis que les tissus lipoïdiques capables d'absorber encore ne reçoivent probablement que le tiers ou le dizième du courant sanguin, phénomène facile à comprendre. Et d'autre part la traversée pulmonaire ne peut pas augmenter la charge du sang.

Si les tissus lipoïdiques restent si loin de leur charge complète, même à la tension basse offerte, leur absorption continuera à se produire toute la durée de la narcose. Et c'est ce que nous avons clairement démontré. Déjà narcotisé le lapin continue d'absorber et autant la 2e demie heure que la première, et la dose qu'il absorbe dépasse de

loin des doses considérées comme mortelles, puisque pour l'homme la dose de 5 gr. aurait produit la mort, et que nos animaux absorbent 0,5 par kil. en une heure.

Mais entre la nocivité de ce chloroforme accaparé prudemment et lentement par des graisses sans importance, et du chloroforme pris en dose massive il n'y a aucun rapport. Les notions de doses toxiques exigeront de radicales revisions quand nous verrons mieux comment les poisons se répartissent dans les organismes.

Mais si ces dépôts ne compromettent pas la vie au moment même, ils rendent la phase d'élimination extrêmement longue, car l'élimination est de plus de la moitié plus lente que l'absorption ; durant l'élimination, la chloroformisation se fait dans le sang par le dépôt de graisse chloroformée. Certes cette chloroformisation à rebours ne permet pas de maintenir la narcose, mais elle maintient facilement un taux d'environ la moitié de celui qui narcotiserait, selon NICLOUX.

N'est-elle pas un facteur notable dans les malaises chloroformiques et dans les conséquences ultérieures sur les tissus ? Des expériences nouvelles devront le démontrer.

Somme toute, la répartition du chloroforme dans le corps ne nous présente plus trop d'énigmes.

C'est à peu près la conception générale de TISSOT qui se réalise ; mais nos expériences ne prêtent pas à critique comme celles de TISSOT, et il y a d'ailleurs de notables rectifications.

1°) Ce n'est pas l'air alvéolaire qui est en défaut, c'est la diffusion trop lente à travers le tissu pulmonaire.

2°) le débit dans les tissus est suffisamment grand pour absorber tout ce que le poumon peut donner au sang ; d'après les chiffres de TISSOT, cela serait devenu incroyable.

3°) les tissus lipoïdiques n'ont jamais leur charge, ils continuent toujours d'absorber à pleine activité, et le dépôt de chloroforme grandirait d'heure en heure. Seulement après une heure ce dépôt uniformément réparti sur le poids de tout l'animal n'est encore que de 50 milligr. par 100 gr. de tissu, et c'est tout ce que le poumon met à la disposition des tissus.

Somme toute, si les lois d'équilibre n'ont pas l'occasion de jouer comme la théorie ancienne de P. BERT et DASTRE l'admettait, c'est que les lois physiques n'apportent pas des doses disponibles suffisantes.

CONCLUSIONS ORIGINALES PROPRES AU MÉMOIRE

1°) La tension de vapeur du chloroforme dans le sang veineux de la narcose n'est que de 1/3 ou 1/4 de la tension de l'atmosphère présentée et correspond à une atmosphère de 2 gr. à 3 gr. pour 100 litres. Cette différence ne saurait résulter d'une ventilation pulmonaire insuffisante.

2°) Elle résulte de ce qu'un seul passage du sang à travers le poumon ne permet au chloroforme que la traversée d'un dixième de ce qui passerait si la durée de contact était plus longue entre le sang et l'air alvéolaire. Le premier contact ne donne que 9 à 14 milligr. de chloroforme à 100 gr. de sang. En 2 ou 3 minutes le taux du sang monte à environ 20 milligr. qu'il ne dépasse souvent pas chez le lapin en narcose non dangereuse.

3°) Le taux du chloroforme sanguin chez le lapin comme chez la chèvre oscille loin sous le taux du chien ; 20 à 30 milligr. au lieu de 50 à 60 milligr.

4°) L'absorption par les tissus dure tout le temps de la narcose (sans diminuer d'intensité durant la 2e demi-heure sur l'absorption de la première demi-heure) et cette absorption se chiffre à 4 à 8 millig. par kilogr. et par minute.

Ces chiffres correspondent parfaitement à la différence qui règne entre le sang veineux et le sang artériel.

5°) L'élimination est beaucoup plus lente, même les premières 20 minutes après la narcose; elle se chiffre par kilo et minute à environ 2 milligr.

6°) Il est prudent de vérifier le % de chlore dans les chloroformes employés pour les dosages.

—

BIBLIOGRAPHIE

P. BERT, *C. R. Ac. Sc.* 1881, 1883 et 1884. *C. R. Soc. Biol.*, 1883.
DASTRE, *Les anesthésiques*, 1890. Paris, Masson.
Dictionnaire de physiologie de Richet : art. anesthésie par DASTRE.
H. MEYER, *Archiv f. exp. Path. und Pharm.*, 1899.
OVERTON, *Studien über die Narcose*; 1901. Iena, Fischer.
M. NICLOUX, *C. R. Soc. de Biol.* 1905 à 1908.
M. NICLOUX, *Les anesthésiques généraux*, 1908. Paris. Doin.
TISSOT, *Journal de phys. et path. gén.* 1906, Janvier et mai.
PÉRIN, LALLEMAND, DUROY, *Du rôle de l'alcool, etc.*, 1860, Paris, Chamerot.
O. SCHMIEDEBERG, *Arch. f. Heilkunde*, 1867, t. VIII.
GRÉHANT et QUINQUAUD, *C. R. Acad. Sc.*, 1883.
L. DE MARTIN, *C. R. Acad. Sc.*, 1888.
I. POHL, *Arch. f. exper. Path. und Pharm.*, 1890-91, t. XXVIII.
M. VERWORN, *Die Narcose.* Iena, 1912.
HARCOURT, *Journal of the chemical Soc.*, 1899.
WALLER, *Journal of physiol.*, 1902.
KOCHMANN, , STANGE et BURKER dans *Arch. intern. de Pharmacod.*, vol. XXII et XXIII, 1912 et 1913, 6 mémoires.
M. KOCHMANN, *Archives intern. de Pharm.*, 1912, vol. XXII.
W. RITSCHELL et O. STANGE, Ib. XXIII, 1913.
W. MADELUNG, *Arch. f. exp. Path.*, 62, 1910.
KRONECKER, *Arch. f. Physiol.*, 1884.
CUSHNY, *Zeitschr. f. Biologie*, 1891.
GEPPERT, *Deutsche med. Woch.*, 1889.
SPENCER, *Arch. f. exper. Path.*, 1894.
ROSENFELD, *Arch. f. exp. Path.*, 1896.
KOCHMANN et STRECKER, *Bioch. Zeitschr.*, 1912.

TABLE DES MATIÈRES.

LABORATOIRE DE PHARMACODYNAMIE DE L'UNIVERSITÉ DE LOUVAIN.
DIRECTEUR : PROFESSEUR M. IDE.

IDIOSYNCRASIES AU CHLOROFORME

PAR LE DOCTEUR

H. MAGOS.

Nous avons rencontré dans nos expériences sur les lapins indigènes des différences si notables dans les doses nécessaires de chloroforme que nous croyons utile de le signaler tant au point de vue expérimental qu'au point de vue théorique.

Peu d'expérimentateurs ont pu déterminer approximativement l'atmosphère nécessaire pour provoquer la narcose chez le lapin. Aussi depuis KRONECKER qui désigna 7,3 à 9 gr. (pour 100 litres d'air) comme dose narcotisante du lapin, on voit les auteurs varier notablement entre eux

pour Geppert	7,5 à 12,5	%
Dunker	7,0 à 7,1	%
Cushny	2,3	%
Rosenfeld	4,8 à 5	%
Kionka	2,5 à 6,6	%
Honigman	6	%
Madelung	5	%
Ritschel et Stange	6,6 à 9,75	%

Il serait assez inutile de discuter ces chiffres, les appareils de dosage doivent être incriminés dans la plupart des cas.

Les derniers, RITSCHEL et STANGE, méritent le plus de crédit : ils ont expérimenté sur 10 animaux en vue d'établir la moyenne.

Mais leur façon de narcotiser et de calculer prête à discussion :

Chaque lapin reçoit, par exemple, successivement et sans interruption, une atmosphère de 5,7 durant 10 minutes ;
puis une atmosphère de 7,3 durant 15 minutes ;
puis une atmosphère de 9,0 durant 15 minutes ;
enfin une atmosphère de 9,9 et il dort à la 6e minute de cette dernière administration, soit à la 46e minute de l'expérience.

Or les auteurs admettent comme dose narcotisante la moyenne entre 9 et 9,9, soit 9,4. Dans ces expériences le facteur « *temps* » nous paraît trop négligé.

Et précisément les deux cas extrêmes ne sont jugés narcotisés qu'après plus d'une heure (64' et 75').

Enfin il n'y a qu'*une* narcose faite par animal.

En réalité le lapin le plus susceptible de Ritschel et Stange a dormi alors qu'il recevait 7 gr. %; leur chiffre 6,6 qu'ils adoptent n'est que la moyenne entre 6,25 qui ne l'avait pas narcotisé et 7 qui l'a narcotisé après 26 nouvelles minutes.

Et le moins susceptible n'ayant pas dormi à 9 gr. fut porté sans transition à 10,4. Rien ne prouve qu'il n'eut dormi avec 9,5.

La méthode des auteurs peut être excellente pour établir une moyenne ; mais s'il s'agit d'évaluer des susceptibilités ou des résistances individuelles au chloroforme, le critique judicieux n'admettra pas cette façon de calculer ; il dira : l'animal A a dormi avec 7 grammes tandis que l'animal B n'a pas dormi avec 9 grammes, différence certaine 23 %, quoique 30 % soit possible.

Chloroformant pour d'autres raisons des groupes de 4 à 6 lapins dans une même grande cage fermée, donc dans la même atmosphère, nous constatons que, ça et là, un lapin ne semble presque pas incommodé par les atmosphères qui narcotisent profondément leurs congénères. Ils ne présentent pas même de période d'excitation et restent en position normale.

Coïncidence : de nombreuses chloroformisations comparatives de lapins, deux à deux, dans une plus petite cage ne nous avaient jamais fait remarquer ce fait.

Pour conserver les termes de comparaison, nous tenons compte du résultat narcotique à obtenir en 10 à 20 minutes.

Ce qui se passe après 30 ou 60 minutes peut déjà être un phénomène plus complexe.

Nous avons soumis isolément les lapins récalcitrants à des expériences répétées en espaçant toutefois les narcoses, pour ne pas les perdre prématurément. Le fait était constant : il fallait à ces lapins soit une atmosphère de 12 gr. par 100 litres, et l'un d'eux exigeait 14 gr. Alors seulement ils passaient par tous les stades d'excitation des lapins normaux qui reçoivent 9 grammes et finissent par s'affaler sur le flanc. Mais la scène de leur narcose ne présente aucune allure anormale.

Intrigué par ce fait, nous cherchâmes à jeter quelques jalons pour l'interprétation. Nous nous contenterons de signaler les expériences auxquelles nous les avons soumis. Les résultats étant négatifs pour l'interprétation, nous nous bornons à un exposé succinct.

1° Nous soupçonnons leur calme d'être la cause d'une respiration insuffisante, quoiqu'il soit difficile d'admettre une apnée réflexe qui dure 15 à 20 minutes.

Nous traversons la paroi de la cage de tiges métalliques raides, mais minces, glissant sans laisser échapper l'atmosphère intérieure : avec ces tiges nous piquons et agaçons les récalcitrants de façon à les faire sauter et fuir devant notre petit instrument de supplice. Vains efforts.

Ultérieurement comme expérience finale nous les installons, canule dans la trachée, sur le circuit fermé, décrit dans le mémoire précédent et nous les forçons à une respiration artificielle identique à celle que nous imposons aux autres lapins, mais cela n'eut aucun résultat à moins de charger l'atmosphère de 30 et 50 % en plus de chloroforme.

2° A tout risque, supposant une action vagotonique possible dans l'intimité des bronches, nous injectons un millgr. d'atropine dans la veine de l'oreille avant de les placer dans la cage à inhalation. Rien n'y est changé : une atmosphère de 10 gr. % les laisse impertubables.

3° Ce n'est pas non plus une question de race : on ne pouvait distinguer les résistants des autres et un groupe de 4 lapins blancs russes se montra complètement normal.

4° Ces animaux récalcitrants au chloroforme soumis à l'étherisation se narcotisaient aux doses normales aussi vite que les autres lapins.

L'idiosyncrasie semble donc spéciale pour le chloroforme.

5° Sacrifiant finalement le plus récalcitrant en pleine narcose, sur canule trachéale, par une atmosphère de 14 gr. % de chloroforme, nous prenons son sang ; et à notre grand étonnement nous ne lui trouvons que 18 mg. de chloroforme par 100 gr. de sang, moins que les lapins ordinaires en narcose.

Si l'idiosyncrasie existait aussi pour l'éthérisation, nous aurions été tentés d'incriminer une anomalie pulmonaire. C'est alors que nous avons soupçonné le taux du chloroforme sanguin de ne pas correspondre à la tension de vapeur et que nous avons entrepris les expériences décrites dans notre mémoire précédent.

S'il existe des animaux récalcitrants, il en existe aussi d'exceptionnellement susceptibles et nous en avons eu récemment un qui se narcotisait jusqu'à l'insensibilité parfaite pour une atmosphère titrée de 5 gr. %.

Le phénomène est étrange et nous n'avons jusqu'ici aucune interprétation plausible ; nous ne pouvons faire que des exclusions : le vagotonus, la ventilation pulmonaire, la race et une résistance générale à tout narcotique ne peuvent pas être incriminés.

Le fait doit être signalé à ceux qui font des narcoses comparatives pour établir des avantages d'associations médicamenteuses ou autres. Ces idiosyncrasies donneraient lieu à des erreurs, tant par les susceptibilités que par les résistances.

Les lapins qui doivent servir à des comparaisons doivent donc être triés par séries et il faudrait éliminer d'abord les susceptibles en

présentant une atmosphère de 6 à 7 gr. pour % qui laissera les normaux indifférents ; puis une atmosphère de 9 gr. % fera reconnaître les récalcitrants.

Nous avons abandonné cette étude qui serait devenue très onéreuse par ces temps de cherté, et qui restera probablement insoluble tant qu'on n'aura pas en mains toutes les données concernant le chloroforme chez les normaux. Avant les anormaux, il fallait connaître les normaux.

Nous concluons donc que certains lapins sont narcotisés par la dose de 5 gr. % et d'autres restent insensibles pendant plus de 20 minutes à une dose de 13 gr. %.

Voilà donc une différence de 130 %. C'est beaucoup plus que les différences extrêmes citées par RITSCHEL et STANGE pour les animaux d'espèce diverse. Mais nous savons par des essais faits sur des souris que les données anciennes sont erronnées et que les souris par exemple ne supportent pas le tiers de la dose du lapin.

P. BERT, *C. R. Acad. Sc.* 1881.
KRONECKER, *Arch. f. Physiol.*, 1884.
ROSENFELD, *Arch. f. exp. Path.*, 1896.
KIONKA, *Arch. f. Klin. Chir.*, 1889.
GEPPERT, *Deutsche med. Woch.*, 1889.
HONIGMANN, *Arch. f. Klin. Chir.*, 1899.
MADELUNG, *Arch. f. exp. Path.*, 1910, vol. 62.
DUNKER, *Thèse doct.*, Giessen, 1907.
RITSCHEL et STANGE, *Arch. intern. de Pharmac.*, 1913.

ISTITUTO DI FARMACOLOGIA DELLA R. UNIVERSITA DI BOLOGNA.
DIRETTO DAL PROF. IVO NOVI.

Crioscopia dei tessuti nella perfusione con H_2O : Nelle idremie di alto grado i muscoli sono i tessuti piu fortemente idrorecettivi

del dott.

GUIDO M. PICCININI
(aiuto e libero docente).

Pei il desiderio di studiare *il problema della regolazione della pressione osmotica* negli animali superiori, già posto dal prof. BOTTAZZI ed illustrato colle sue ricerche sugli animali acquatici, ho compiuto questa prima serie di ricerche dirette a scoprire in quale misura vi possano prendere parte i vari tessuti, quando l'organismo si trovi in uno stato tutto particolare, quale è quello in cui H_2O circoli col sangue, essendo essa direttamente introdotta in un' arteria. Mancano dati relativi a queste mie condizioni sperimentali, e gli esiti avuti mi pare che illuminino il problema.

Li rendo perciò noti, pur dichiarando che essi formano solamente un primo abbozzo, saranno ampliati col variare le cause e le condizioni della idremia, coll' estendere l'analisi agli organi lasciati ora in disparte, col prendere in esame particolare quel tessuto o quei tessuti che già richiamano l'attenzione per le cifre che hanno dato, e col determinare nel tempo stesso *i valori della conducibilità elettrica*, che non dovrebbero mai andare disgiunti da quelli della pressione osmotica.

Non parlerò qui delle azioni provocate dall' H_2O perfusa nell'organismo, nè della tecnica della perfusione, perchè di esse ha scritto il mio maestro prof. NOVI nella sua memoria sperimentale intorno alle variazioni quantitative dei lipoidi del cervello, prodotte dall'H_2O circolante nel sangue. Non m'indugierò sopra la tecnica per la ricerca del Δ dei tessuti, perchè essa è stata ben concretata (SABBATANI, 1901 ; FREDERICQ, 1902). Dirò tuttavia che l'H_2O è introdotta nel moncone periferico della carotide, ora destra ora sinistra, a 40° C., con velocità costante, continuata fino all'arresto del respiro ; questo nei cani 8 e 9 fu ridestato colla respirazione artificiale, cessando in quel tempo la perfusione e riprendendola poi fino all'arresto definitivo. In entrambi i casi, il cuore pulsa allora per alcuni istanti ancora, cosi mentre le ultime quantità di H_2O possono distribuirsi equamente in tutta la massa sanguigna, si ha il tempo di fare cadere

dall'arteria direttamente nel tubo crioscopico raffreddato il sangue. Il cane è quindi subito decapitato, si raccoglie altro sangue per averne siero, si tolgono gli organi, si asciugano accuratamente e si chiudono in vasi di vetro con tappo smerigliato. Di poi, senza por tempo in mezzo, si fa una poltiglia di parte di ognuno e vi si determina il Δ. Per questo esame, sonc passatò da un organo all'altro seguendo il medesimo ordine per tutte le esperienze. Lo stesso procedimento si è seguito per gli organi normali, e per le due serie l'esame fu compiuto alla stessa temperatura ambiente, di modo che si ha la sicurezza di potere fare un paragone esatto fra le due serie delle cifre analitiche.

La tab. I contiene le cifre dell'abbassamento del punto di congelazione del sangue e dei tessuti, sia dei cani normali sia di quelli perfusi con l'H_2O.

Tab. I. — Δ del sangue e degli organi di cani normali e di cani perfusi con H_2O.

Nr	CANI NORMALI			sangue		encefalo	fegato	rene	milza	muscoli striati
				intero art.	siero					
1	bracco ♀ a., kg. 6.2	uccisi per dissanguamento 5 ore dopo il pasto		0.56	0.57	0.68	1.07	0.85	0.79	0.88
2	lupo ♂ b. a. kg. 9.2			0.58	0.60	0.69	1.08	0.92	0.83	0.89
3	danese ♂ g. kg. 26.0			0.59	0.60	0.68	0.98	0.90	0.75	0.86
4	pastore ♀ a. kg. 15.6			0.58	0.61	0.70	1.00	0.92	0.81	0.88
		media : Δ_1 =		0.57	0.59	0.68	1.03	0.89	0.79	0.87
	Cani perfusi 5 ore dopo il pasto	cm³ di H_2O.								
		per kg. e per m'	in totale e fino a †							
5	bracco b. g. ♀ kg. 10.0	1.63	530	0.60	0.59	0.70	0.87	0.73	0.70	0.83
6	barbone v. ♂ kg., 16.9	3.14	604	0.60	0.58	0.67	0.85	0.72	0.73	0.83
7	lupetto a. ♀ kg. 5.0	5.83	382	0.57	0.60	0.69	0.84	0.81	0.71	0.82
			media : Δ_2 =	0.59	0.59	0.68	0.85	0.75	0.71	0.82
8	bracco a.b. ♂ kg. 18.0	7.13	2240	0.59	0.58	0.70	0.83	0.68	0.72	0.63
9	pastore g. ♀ kg. 16.0	6.90	2165	0.59	0.58	0.70	0.81	0.69	0.72	0.59
			media : Δ_3 =	0.59	0.58	0.70	0.82	0.68	0.72	0.61

(a = adulto ; v. = vecchio ; g. = giovane ; b. = bastardo)

Queste cifre ci dicono prima di tutto che *il valore crioscopico medio dei tessuti normali* (Δ_1), dato dalle mie analisi, sta nei limiti delle pochissime cifre che si conoscono da pubblicazioni precedenti (SABBATANI, 1901; JAPPELLI, 1904). Solo quello del fegato si presenta un poco

più alto, ma rientra nei valori trovati da LIAGRE (1904). Può essere legato allo svolgersi della digestione, dato il momento in cui fu tolto l'organo dall'animale, ma non ne può essere causa l'autolisi dei tessuti isolati, perchè il Δ fu ricercato poco dopo la morte del cane, immediatamente dopo quello del sangue e del cervello. Pertanto, *il valore normale di* Δ, dato dalle mie analisi, conferma che gli organi hanno fisiologicamente una determinata concentrazione molecolare loro propria, sempre diversa e più elevata di quella del sangue ; concentrazione che per alcuni d'essi sta in rapporto con speciali funzioni loro, e che, ad esempio, per il fegato e per il rene, dimostra la incessante attività metabolica del primo, secretiva del secondo (SABBATANI, 1909).

Ma i fatti nuovi che risultano dalle mie analisi sono i seguenti :

1° Al termine della perfusione, *il* Δ *del sangue e del cervello non sono mutati*, qualunque sia la dose di H_2O iniettata ; invece *il* Δ *degli altri organi è sempre diminuito*, spesso in grado considerevole.

Quanto al sangue, si può quindi dire che l'acqua non vi resta, essa passa negli organi abbassando la loro pressione osmotica ; il passaggio è rapido, come del resto è assai rapido, e ciò è noto, il passaggio dei farmaci dal sangue nei tessuti (HEYMANS). Che vi debba essere un tempuscolo in cui il Δ del sangue si muti, non v'ha dubbio; si tratta di colpirlo con l'esame, come è riuscito al JAPPELLI (1904) nelle sue iniezioni endovenose di cloruro sodico in soluzione ipotonica. Con soluzioni ipertoniche invece, e più ancora con soluzioni di alcoli (SABBATANI, 1909), il Δ del sangue muta per una certa durata, ciò che non avviene per l'H_2O ; la quale cosa lascia concludere che la perfusione di H_2O non altera la concentrazione del sangue in sostanze osmoticamente attive, e che perciò non disturba i meccanismi regolatori della pressione osmotica sua, la quale rapidissimamente si regola, come in molteplici altre circostanze avviene (HAMBURGER, 1890).

Quanto al cervello, il suo Δ non muta o, invece di abbassarsi come negli altri organi, tende ad aumentare in seguito a forte perfusione (Δ_3). Ma prima di commentare questa differenza, bisogna ricordarsi che lo stesso valore 0.70 diede un cane normale (cane 4). Ad ogni modo, il contegno del Δ del cervello può costituire un fatto tutt'altro che trascurabile, e sarà ulteriormente indagato insieme colla percentuale di acqua e di ceneri, e ponendo mente anche al fatto della sottrazione di lipoidi dal cervello operata dall' H_2O (NOVI, 1917), della decalcificazione sua per opera delle soluzioni fisiologiche (NOVI, 1911), dell' aumento del suo valore crioscopico (da 0,71 a 1,02 nei conigli) in seguito ad infusioni di soluzioni di NaCl al 25 % (SABBATANI, 1909).

Quanto agli altri organi, l'esame delle medie e delle differenze presentate nella tab. II porta alle seguenti constatazioni :

Tab. II. — Valore medio di Δ, secondo la tab I

sangue e organi	normali	perfusi con H_2O cm₃ 3,55 per kg e m'	cm₃ 6,81 per kg e m'	differenze	
	Δ_1	Δ_2	Δ_3	$\Delta_1 - \Delta_2$	$\Delta_1 - \Delta_3$
sangue	0.57	0.59	0.59	—0.02	+0.002
siero	0.59	0.59	0.58	—	—0.001
encefalo	0.68	0.68	0.70	—	+0.002
fegato	1.03	0.85	0.82	—0.18	—0.210
rene	0.89	0.75	0.685	—0.14	—0.205
milza	0.79	0.71	0.72	—0.08	—0.070
muscoli	0.87	0.82	0.61	—0.05	—0.260

(per kg e m' = per kg cane e per minuto primo).

2° Al termine della perfusione, *il Δ del fegato, rene, milza e muscoli striati è sempre diminuito*, e tanto più quanto maggiore è stata la quantità di H_2O iniettata (confronta Δ_2 con Δ_3, ed entrambi con Δ_1) ; e più precisamente :

a) dopo perfusione moderata (Δ_2), la differenza dal Δ normale fa disporre gli organi in quest'ordine decrescente : *fegato — rene — milza — muscoli* ;

b) dopo perfusione di alto grado (Δ_3), l'ordine non si mantiene tale, ma s'inverte in questo modo : *muscoli — rene — fegato — milza.*

3° Tutto ciò significa che, durante un'idremia, fegato, rene, milza e muscoli funzionano da *recettori d'acqua*, perchè la differenza tra i due Δ, quello normale (Δ_1) e quelli dopo perfusione (Δ_2 e Δ_3), ci rappresentano un avvenuto *carico d'acqua* da parte degli organi stessi, il quale vi produce una diluizione in sostanze osmoticamente attive. Nelle condizioni ordinarie viene *prima il fegato* nell'ufficio di scaricare acqua dal sangue, e subito dopo il rene, mentre a grande distanza seguono la milza e i muscoli (cfr tab. II). Ma fegato e rene si mostrano non più sufficienti in cotesto ufficio nei casi di grandi idremie, di perfusione di forte quantità di acqua.

Un nuovo tessuto allora interviene, e vi prende parte in così alto grado da mettersi *in prima linea* nell'ufficio di scaricare il sangue dall'acqua : *esso è il tessuto muscolare.*

Dati più o meno analoghi a quest'ultimo non mancano nella letteratura : quelli del Loeb (1908), di Cooke (1898) e dell' Overton

(1902) sui cambiamenti di volume e di peso dei muscoli immersi in soluzioni saline ipo- e ipertoniche ; quelle di DURING (1901) sulla perdita d'acqua da parte dei muscoli della rana ; quelli del JAPPELLI (1906), per consiglio del prof. BOTTAZZI, sulle varazioni del Δ del succo muscolare in seguito ad infusioni di liquidi ipertonici ed ipotonici.

Ma *le mie esperienze fanno dare maggiore importanza ai muscoli* come tessuto avente l'ufficio di ricevere e trattenere l'acqua durante le idremie, in quanto li mettono in rapporto con gli altri tessuti, e in quanto lasciano prevedere a quale alto grado possa arrivare il fatto, se si pone mente che il tessuto muscolare rappresenta il 40 % circa del peso corporeo, è ricco di sali, molto ricco di vasi sanguigni ; se si pensa ai mutamenti della sua composizione chimica in certi stati dell'organismo (digiuno, sete, edema lavoro). Tale ufficio di recezione d'acqua, che il muscolo presenta durante le idremie, può stare in relazione o, meglio, può avere stretti rapporti con l'altro suo di *svelenatore del sangue*, in grado eguale ed anche superiore al fegato in circostanze speciali, come mostrano le esperienze del WORONZOW (1913).

4° Frattanto i miei dati presentano l'abbozzo di una *scala*, che mostra quale e quanta parte è devoluta ad ogni organo in uno dei mezzi dell'intrecciato *meccanismo regolatore della pressione osmotica* : scala che riceverà maggior valore dalle cifre della conducibilità elettrica, che vado determinando.

Sull' argomento si consultino :

IVO NOVI, Effetti di H_2O circolante nel sangue sui lipoidi del cervello. *Memor. R. Accad. Scienze Bologna*, 1916-17, *serie VII, t. IV, p.* 245-56. Bibliografia.

F. BOTTAZZI, Pressione osmotica e conduttività elettrica :

a) nella sua « Chimica fisica... » *Milano, Soc. Edit. Libraria*, 1906, *cap. IX* ;

b) nel : *Ergebnisse der Physiol. (Asher-Spiro)*, 1908, *VII*, 161-402.

c) nell' *Arch. di Fisiol.*, 1906, *III*, 416-446 ; 494-506 ; ecc.

L. SABBATANI, Come gli alcoli metilico ed etilico modificano la concentrazione molecolare del sangue e degli organi. *Arch. di Fisiol.*, 1909 *VII* 49-80.

A. DURING, Wassergehalt und Organfunction. *Pfluger's Arch.*, 1901, *LXXXV*, 401-505.

W. N. WORONZOW, Ueber die Entgiftung von Giftlösungen durch die Muskulatur überlebenden Extremitäten. *Intern. Beitr. zur Pathol. und Therap. der Ernährungsstörungen*, *IV*, 30 ; *Bull. Instit. Pasteur*, 1913, *XI*, 1012.

Bologna 6 giugno 1921.

intéressant, au moment où une nouvelle édition du Codex est en préparation, de reprendre, du point de vue expérimental d'abord, l'étude de la toxicité du sel officinal de Cicutine, et d'essayer ensuite d'en fixer avec quelque rigueur la posologie chez l'homme.

Toute étude thérapeutique doit, en effet, avoir comme préface une étude toxicologique, car c'est en définitive par la connaissance de l'équivalent toxique d'un corps que l'on arrive à la détermination de son équivalent thérapeutique. Cela étant, et avant d'exposer le résultat de mes recherches personnelles sur la toxicité du Bromhydrate de Cicutine, je dois rappeler sommairement les travaux déjà anciens touchant la toxicité de la Cicutine proprement dite, car il convient de souligner que pendant longtemps c'est la Cicutine et la Cicutine seule, je veux dire l'alcoloïde libre, qui fit l'objet des travaux des toxicologues, de même d'ailleurs que c'est la Cicutine et la Cicutine seule qui, pendant longtemps fut utilisée en Thérapeutique. Le fait mérite d'être retenu, car il est de nature à expliquer quelques-uns des résultats en apparence paradoxaux que l'on peut relever, tant dans les observations des toxicologues que dans celles des médecins au sujet de l'action de la Cicutine ou de ses sels.

Je ne rappellerai ici que pour mémoire que les propriétés toxiques de la Ciguë sont connues depuis la plus haute antiquité et que le χωνειον était le poison judiciaire des Grecs. Il y a toutes sortes de raisons d'admettre que la Ciguë qui servait à préparer le breuvage des condamnés de l'aréopage athénien était notre grande Ciguë. Il suffit en effet de relire le récit de la mort de Socrate dans le dialogue de Phédon pour retrouver, dans le tableau des symptômes présentés par Socrate, les traits essentiels de l'empoisonnement par la grande Ciguë.

La symptomatologie de l'intoxication par la Ciguë, c'est-à-dire par le suc de la plante, n'est cependant pas exactement superposable à la symptomatologie de l'intoxication par la Cicutine proprement dite. C'est que, ainsi que l'a montré G. POUCHET, il y a dans la Ciguë autre chose que de la Cicutine ou autres alcaloïdes voisins ; il y a des substances du groupe des résinoïdes — Cicutoxine, œnanthatoxine —, peut-être même des albuminoïdes susceptibles d'intervenir dans une très large mesure dans l'évolution des phénomènes d'intoxication.

Quoiqu'il en soit, BRANDES, en 1826, après avoir isolé de la Ciguë, au moyen de l'alcool, un principe alcalin résineux qu'il nomma CONIN, expérimenta ce produit chez les animaux et lui reconnut des effets analogues à ceux de la Strychnine. L'année suivante, GIESEKE isola l'alcaloïde de la Ciguë en en distillant les semences avec les alcalis, et il en établit aussi le pouvoir toxique énergique. GEIGER donna au nouvel alcaloïde le nom de *Cicutine* et il constata qu'il tuait en produisant des convulsions et des vomissements. En 1836, BOUTRON, CHARLARD et HENRY isolent à leur tour l'alcaloïde de la Ciguë, ils

lui donnent le nom de *Conicine* et constatent comme les auteurs précédents qu'il tue en donnant *d'horribles* convulsions. Retenons en passant ce fait très net qui se dégage de tous ces premiers essais expérimentaux effectués avec la Cicutine plus ou moins pure employée par les chimistes que nous venons de citer, c'est qu'elle est convulsivant, au point d'avoir pu être comparée à la Strychnine.

Plus tard d'autres physiologistes, et notamment MARTIN DAMOURETTE et PELVET, essayeront de montrer que ceci est dû soit à ce que dans ces premières expériences l'empoisonnement a été produit à l'aide de très fortes doses, soit, aussi, aux autres substances accompagnant les produits expérimentés *comme Conicine*.

Depuis les premières recherches dont je viens de parler, en effet, la Cicutine a fait l'objet d'un grand nombre de travaux, parmi lesquels on peut citer ceux de CHRISTISSON (1836), de SCHROFF (1852), de KÖLLICKER (1856), de GUTTMANN (1866), de GUBLER (1868), d'OLIVIER et BERGERON (1867), et enfin le travail particulièrement important de MARTIN DAMOURETTE et PELVET (1869). Il serait sans intérêt d'analyser ici ces différents travaux, notre but n'étant pas de refaire une étude pharmacodynamique complète de la Cicutine, mais plutôt de faire plus complètement que cela n'a été fait jusqu'ici une étude toxicologique du Bromhydrate de Cicutine, c'est à dire du sel officinal (1). Je me bornerai donc à retenir de ces travaux quelques faits ou quelques opinions de nature à fixer les idées sur l'activité toxique de la Cicutine proprement dite, c'est à dire de l'alcaloïde libre employé par la plupart des auteurs dans leurs expériences.

Dans cet ordre d'idées je rappellerai que CHRISTISSON et GEIGER considéraient que la Cicutine est, après l'acide prussique, le plus violent et le plus redoutable des poisons : une goutte instillée dans l'œil d'un lapin amènerait la mort en 9' et il suffirait de 3 gouttes pour tuer le même animal en 40''.

LÉON MARCHAND, qui a signé l'article Ciguë du *Nouveau Dictionnaire de Médecine et de Chirurgie pratiques*, écrit (p. 622), à propos de la Cicutine : « Cette dernière préparation est un poison très violent qu'on ne doit manier qu'avec la plus grande précaution comme on peut en juger par la formule suivante » :

SOLUTION DE CICUTINE.

Cicutine	0 gr. 10
alcool............................	1 gr.

à prendre 3 gouttes sur un morceau de sucre.

(1) Nous renvoyons le lecteur désireux de se documenter sur le côté pharmacodynamique proprement dit de la question aux *Leçons de Pharmacodynamie et de Matière Médicale* (5e série, p. 636 et suivantes), du Professeur POUCHET. Il y trouvera un exposé historique et critique précis de tous les travaux publiés sur la Cicutine de 1836-1880.

OLLIVIER et BERGERON, qui ont rédigé la partie thérapeutique et toxicologique du même article, écrivent : « Nous ne pouvons dire à quelle dose la Ciguë peut donner la mort. S'il s'agissait de la Conicine on pourrait dire que 4 à 5 gouttes de l'alcaloïde récemment préparé suffisent pour amener la mort ».

MARTIN DAMOURETTE et PELVET ont également employé dans leurs recherches la Cicutine libre. Comme leurs devanciers ils constatèrent la très grande activité de cet alcaloïde et il suffira pour en donner une idée de rappeler les titres protocolaires de quelques-unes de leurs expériences :

Exp. XIX (du 28-8bre-1867) :
Empoisonnement par l'insertion (dans une petite plaie artificielle) d'une goutte de Cicutine, d'un jeune chat qui présenta le cortège complet du Cicutisme.

Exp. XX (du 29-8bre-1867) :
Jeune chien empoisonné par l'insertion d'une goutte de Cicutine ; les symptomes généraux n'éclatent que 4 heures après l'insertion ; il y a de la paralysie et des convulsions ; on constate les lésions de la suffocation.

Exp. XXI (du 23-7bre-1868) :
Empoisonnement d'un rat par 3 gouttes de Cicutine dans la bouche ; phénomènes tétaniques ; mort en 7' par asphyxie mécanique.

Exp. XXII (du 1er-8bre-1868) :
Mort d'un chien en 10 minutes par injection (à l'aine droite) de deux gouttes de Cicutine ; mort par arrêt des phénomènes respiratoires.

Ainsi, on le voit, c'est la Cicutine libre qui a surtout été expérimentée jusqu'ici, et tous les physiologistes l'ont considérée comme un corps énergiquement toxique, qu'il convient de n'employer chez l'homme qu'avec les plus grandes précautions, d'où les doses oscillant autour de quelques milligr. admises par la plupart des Thérapeutes comme doses médicamenteuses. Cependant, si l'on examine de près les protocoles des expériences que nous venons de rappeler, on reconnaît aisément que, si l'on cherche à estimer pondéralement le nombre de gouttes de Cicutine indiquées par les auteurs comme voisines de la dose toxique, les chiffres trouvés sont tout de même supérieurs à ceux par lesquels on a coutume de représenter les doses thérapeutiques.

Nous ne connaissons pas exactement le poids de la goutte des Cicutines employées par tous les auteurs précédents dans leurs expériences, mais nous trouvons au moins une indication de cet ordre dans les expériences d'ORFILA faites à l'aide d'une Cicutine préparée par lui et dont XII gouttes pesaient 0 gr. 48. Cette dose administrée à un chien de taille moyenne amena la mort de l'animal en 5'. Mais pas plus ORFILA que les autres expérimentateurs déjà cités ne paraissent s'être préoccupés de déterminer les doses non léthales de Cicutine. En faisant état cependant de quelques chiffres relevés dans les protocoles d'expériences de divers auteurs nous pouvons considérer que 1/4 de goutte

de Cicutine, soit 0 gr. 01, par kilogr. d'animal, n'est pas une dose mortelle. Si l'on transportait cette donnée à l'homme on trouverait qu'un homme de 60 kilogr. pourrait supporter 0 gr. 60 de Cicutine, soit 0 gr. 98 de Bromhydrate de Cicutine, ce sel ne renfermant que 61 °/₀ de base. Mais on sait les réserves qu'il y aurait à faire à une semblable déduction.

Quoiqu'il en soit, on voit en définitive que les Thérapeutes, dans la fixation de la posologie des sels de Cicutine, paraissent s'être plutôt inspirés de l'*opinion générale* des Physiologistes touchant la grande toxicité de la Cicutine que des chiffres donnés par eux dans les protocoles de leurs expériences.

Enfin on ne s'est pas demandé non plus si les propriétés si énergiquement toxiques de la Cicutine ne tenaient pas, au moins pour une part, à quelqu'une de ses propriétés physico-chimiques, à sa qualité de base libre, volatile, très alcaline, par exemple? En vérité, cependant, la lecture attentive des mémoires, de celui de MARTIN DAMOURETTE et PELVET notamment, ne laisse aucun doute sur l'importance des propriétés physico-chimiques de la base libre dans la production de quelques-uns des effets qu'on lui attribue. Il est bien évident, par exemple, qu'il y a relation de cause à effet entre les propriétés physico-chimiques de la base libre et ses propriétés irritantes locales ou ses propriétés altérantes, telles qu'on les trouve résumées dans la première conclusion du mémoire de MARTIN DAMOURETTE et PELVET, que voici :

A. — L'action locale de la Cicutine sur les éléments nervo-musculaires se traduit par une courte période d'excitation révélée par la *douleur* et la *contractilité* des fibres musculaires, bientôt suivies de l'effet spécial et caractéristique du Cicutisme local : l'anesthésie et l'acinésie. Cette double propriété sédative du système nervo-musculaire rend un compte satisfaisant des effets curatifs locaux de la Ciguë contre les éléments douleur et spasme dans les maladies et autoriserait l'emploi des injections hypodermiques de Cicutine *étendue*. Une deuxième action locale bien plus importante est celle qu'exerce la Cicutine sur les éléments anatomiques qu'elle *altère* et même *désorganise* complètement suivant son degré de concentration. Ainsi, elle gonfle et désagrège les hématies, attaque et détruit les épithéliums, altère profondément la structure des éléments nerveux et musculaires. Cette atteinte des éléments histologiques, cette sorte d'*action altérante* directe qui s'exerce sur les surfaces d'élimination du médicament (peau et muqueuses), aussi bien que sur les surfaces d'entrée, explique la *propriété résolutive* des préparations Cicutées dans les dartres, les catarrhes, les ulcères, qu'ils soient de nature herpétique, scrofuleuse ou syphilitique, par l'*attaque* des néoplasmes qui les constituent. Nos expériences établissent que les organismes inférieurs sont influencés et détruits par la Cicutine comme le sont les éléments anatomiques. De là dérivent évidemment les propriétés antiseptiques et parasiticides bien constatées de la ciguë et de son alcaloïde contre les ulcères putrides, les teignes, la gale, les entozoaires, etc. L'action diffusée de la cicutine se traduit encore par la double propriété dynamique et altérante en agissant sur le système nervo-musculaire, sur le sang et sur les éléments anatomiques les moins condensés. »

Et dans la pensée des auteurs, cette action altérante de la Cicutine est telle qu'ils n'hésitent pas à y voir toute l'explication de son rôle thérapeutique.

« Nous n'hésitons donc pas à conclure que la Cicutine est un médicament du groupe de ceux qu'on appelle *altérants*. De là résulte que le sang cicuté est évidemment moins propre à l'hématose et par suite à la calorification et aux transformations chimiques de la nutrition, soit dans l'ordre normal, soit dans l'ordre pathologique. Il ne nous répugne donc pas d'admettre que le traitement cicuté peut enrayer la formation et le développement des néoplasies diverses par lesquelles s'expriment les grandes diathèses (la dartre, le rhumatisme, la scrofule, peut-être le cancer). Il ne nous paraît même pas impossible que la Cicutine n'attaque les hyperplasies en voie de formation peu avancées, puisque nous l'avons vue détruire des éléments anatomiques aussi résistants que les épithéliums. Ces deux actions combinées rendraient compte des succès incontestables des préparations cicutées, non seulement contre les manifestations de la scrofule, du rhumatisme chronique, de la dartre, de la syphilis, mais encore contre des tumeurs d'apparence cancéreuse dont la plus sage pratique offre des exemples ; ce qui suffit à nos yeux pour engager le médecin à ne pas se laisser enchaîner par le dogme de l'incurabilité du Cancer » (1).

Ainsi donc, c'est la Cicutine libre qui a été étudiée tout d'abord par les physiologistes, et soit que les produits essayés ne fussent pas purs, soit que les propriétés fortement alcalines de la base libre soient susceptibles de provoquer des actes réflexes pouvant aboutir à l'arrêt du cœur ou de la respiration, la Cicutine proprement dite est apparue comme un poison redoutable, comparable, au dire de CHRISTISSON, nous l'avons vu, à celle de l'acide prussique.

En présence de cette opinion des Physiologistes, les Thérapeutes ne pouvaient naturellement qu'observer la plus prudente réserve dans leurs tentatives d'administration de la Cicutine à l'Homme : d'où la posologie très timorée adoptée par les premiers médecins qui firent usage de cette substance, et qui a été conservée par la plupart des médecins modernes.

Ce sont ces considérations qui m'ont engagé à reprendre l'étude toxicologique expérimentale du Bromhydrate de Cicutine. J'ai fait dans ce but un grand nombre d'expériences à l'aide des différents animaux de laboratoire et j'ai pu aussi étudier chez l'Homme dans divers services de la Charité les effets du Bromhydrate de Cicutine administré à doses croissantes.

Je me suis servi pour ces expériences d'un produit très pur provenant de la collection du Laboratoire de Toxicologie de la Faculté de Pharmacie et que je dois à l'obligeance de M. le Professeur GUERBET à qui j'adresse mes plus vifs remerciments (2).

---

(1) MARTIN DAMOURETTE et PELVET. Etude de Physiologie expérimentale et thérapeutique de la Ciguë et de son alcaloïde. *Gazette Médicale de Paris*, 1870, p. 488.

(2) Je dois aussi des remerciments à M. le professeur agrégé GUILLAIN et à M. le Dr TIXIER, médecins de la Charité, pour l'intérêt qu'ils ont bien voulu prendre à cette étude, ainsi qu'à M. DUVAL, interne des hôpitaux, pour le concours qu'il a bien voulu me prêter en prenant avec le plus grand soin les observations des malades soumis au traitement cicuté.

II

Détermination de l'équivalent toxique du Bromhydrate de Cicutine

Rien n'est plus difficile, comme on sait, que de déterminer avec précision l'équivalent toxique d'un corps. Cet équivalent ne saurait, dans aucun cas, être exprimé par un chiffre absolument fixe, invariable, ayant la valeur d'une constante physique, car suivant l'espèce animale considérée, voire dans la même espèce, on peut observer des variations souvent assez considérables dans la sensibilité à un poison donné. Il est donc, avant tout, essentiel dans des expériences de toxicité de noter avec le plus grand soin, dans les protocoles, les conditions dans lesquelles ont été obtenus les résultats observés. Ces réserves faites, voici les résultats observés dans nos expériences sur la toxicité du Bromhydrate de Cicutine.

I. — Expériences sur la Grenouille.

Dates des Expér^ces	Espèce, Sexe, Poids de l'animal	Titre et Quantité de la solution injectée	Heure de l'injection	RÉSULTATS et OBSERVATIONS.
3.1.20	Gr. rousse ♀ 48 gr.	1/4 cc. sol. à 1/1000.	14h.30	Très légère parésie. Survie.
5.1.20	Gr. rousse ♀ 52 gr.	1 cc. sol. à 1/1000	16h.20	L'animal est trouvé mort le lendemain.
6.1.20	Gr. rousse ♀ 55 gr.	1 cc. sol. à 2,5 0/00	15h.35	Mort le 9-1-20, à 10 h.
8.1.20	Gr. rousse ♀ 67 gr.	1/2 cc. sol. à 5 0/00	15h.35	Mort le 10-1-20, à 14 h.
10.1.20	Gr. rousse ♂ 40 gr.	1 cc. sol. à 10 0/00	15h.30	Les deux animaux succombent à peu près simultanément à 16h.45.
10.1.20	Gr. rousse ♂ 42 gr.	2 cc. sol. à 10 0/00	15h.35	
14.1.20	Gr. verte ♂ 72 gr.	2 cc. sol. à 5 0/00	9h.45	11h. : Phénomènes de parésie. 11h.30 : paralysie à peu près complète. 11h.45 : L'animal est en état de mort apparente dans l'après-midi il se remet complètement et les jours suivants il paraît normal.
15.1.20	Gr. verte ♀ 43 gr.	1,5 cc. sol. à 10 0/00	11h.5	L'animal est trouvé mort dans l'après midi.

On voit, d'après les résultats consignés dans le tableau précédent, que la dose toxique et sûrement mortelle de Bromhydrate de Cicutine est comprise entre 0 gr. 010-0 gr. 015.

II. — Expériences sur la Souris.

Dates des Exp^ces	Poids de l'animal	Titre et Quantité de la sol. injectée	Heure de l'injection	RÉSULTATS et OBSERVATIONS.
12.4.20	14 gr.	1/2 cc. sol. à 5 0/00		
13.4.20	15 gr.	1 cc. » »	15h.37	15h.47 L'animal se déplace difficilement. 15h.50 Quelques mouvements convulsifs. L'animal mis sur le dos ne peut pas se redresser. Ouvre la bouche comme pour faire de larges aspirations, mort à 15h.56.
15.4.20	17 gr.	1 cc. sol. à 10 0/00	14h.40	14h.45 Courte période d'agitation. 14h.46 L'animal s'allonge sur le ventre. 14h.51 Mort.
15.4.20	15 gr.	1/2 cc. sol. à 10 0/00	14h.52	Un peu d'agitation. Mort le lendemain à 15 h.
17.4.20	18 gr.	1 cc. sol. à 10 0/00	14h.18	Courte période d'agitation. L'animal s'allonge sur le ventre, pattes postérieures en extension, quelques secousses convulsives. Mort à 14h.42.
17.4.20	16 gr.	1/2 cc. sol. à 10 0/00	15h.35	15h.40 Un peu d'agitation, machonnement. 15h.45 Sorte de tremblement de tout le corps. L'animal semble piétiner sur place sans pouvoir avancer. 14h.47 L'animal s'allonge sur le ventre, pattes postérieures en extension, quelques secousses convulsives. Mort à 15h.49.
18.4.20	18 gr.	1 cc. sol. à 10 0/00	14h.55	Mort à 15h.1.
18.4.20	17 gr.	1/2 cc. sol. à 10 0/00	14h.57	Mort à 15h.5'. Dose mortelle comprise entre 0 gr.005 et 0 gr.010.

III. — EXPÉRIENCES SUR LE COBAYE.

Dates des Exp^{ces}	Poids et Sexe de l'animal	Titre et Quantité de la sol. injectée	Heure de l'injection	Lieu de l'injection	RÉSULTATS et OBSERVATIONS
22.4.20	♂ 355 grs	1 cc. sol. à $^0/_{00}$ (0gr.014 par k^0)	15h.30	sous-cutanée	L'animal meurt le 28.4.20.
3.5.20	♀ 475 grs	1 cc.5 sol. à 10 $^0/_{00}$ (0gr.021 par k^0)	14h.55	intrapéritonale	Survie.
8.6.20	même animal	2 cc. sol. à 10 $^0/_{00}$ (0gr.042 par k^0)	14h. 5	»	Survie.
11.6.20	»	3 cc. sol. à 10 $^0/_{00}$ (0gr.063 par k^0)	14 h.	»	Survie.
12.6.20	»	4 cc. sol. à 20 $^0/_{00}$ (0gr.168 par k^0)	16h.5	sous-cutanée	Mort à 16h.20.
12.6.20	♂ 740 grs	2 cc. sol. à 20 $^0/_{00}$ (0gr.054 par 12^0)	16h.43	intrapéritonale	Survie.
14.6.20	même animal	3 cc. sol. à 20 $^0/_{00}$ (0gr.081 par k^0)	16h.47	»	Mort à 17h.15.
18.6.20	♂ 500 grs	5 cc. sol. à 10 $^0/_{00}$ (0gr.10 par k^0)	14h.20	»	Mort à 14 h.35.
					Dose mortelle = 0,08 à 0,09 par k^0.

IV. — Expériences sur le Lapin et le Chat

Dates des Expér[ces]	Poids et Sexe des animaux	Titre et Quantité de la sol. injectée	Heure de l'injection	Lieu de l'injection	RÉSULTATS et OBSERVATIONS.
	(Lapins)				
24.11.20	♀ 2740 gr.	5 cc. sol. à 5 °/oo (ogr.0091 par k°)	16h.40	intraveineuse (v. marginale)	Aucun phénomène apparent, sinon un peu de polypnée qui ne persiste pas.
24.11.20	♀ 2470 gr.	10 cc. sol. 5 °/oo (ogr.020 par k°)	17h.15	»	» »
25.11.20	♀ 2740 gr.	3 cc.5 sol. à 20 °/oo (ogr.0255 par k°)	15h.25	»	15h.28 : un peu d'agitation ; polypnée. 15h.30 : l'animal s'étend sur le ventre, les pattes écartées. 15h.36 : se couche sur le côté ; 68 respirations par minute. 15h.45 : mort.
25.4.20	♀ 2470 gr.	3 cc. sol. à 20 °/oo (ogr.026 par k°)	16h. 7	»	Mêmes phénomènes ; mort à 16h.20.
	(chat)				
6.3.20	♀ 2300 gr.	5 cc sol. à 10 °/oo (ogr.0217 par k°)	14h.10	jugulaire	(Voir tracé, fig. III). Dose mortelle, par voie veineuse, tant chez le chat que chez le lapin = ogr.025 à ogr.026.

V. — EXPÉRIENCES SUR LE CHIEN.

Dates des Exp[ces]	Poids et Sexe de l'animal	Titre et Quantité de la solution administrée.	Heures	Modes d' administration	RÉSULTATS et OBSERVATIONS.
3.5.25	Ch. bâtardi ♂ (8k.500)	20 cc. sol. à 1 p. °/° (0gr.023 par k°)	14h.	voie stomacale	Aucun trouble apparent.
5.5.21	Même animal	30 cc.sol. à 1 °/° (0.035 par k°)	15h.	»	15h.15 : l'animal vomit ; aucun autre trouble apparent.
10.5.21	Ch. genre Loulou ♀ 6k.200	20 cc. sol. à 1 °/° (0gr.032 par k°)	15h.15	inj. s/cutanée	Aucun trouble apparent.
21.5.21	Même animal	30 cc. sol. à 1 °/° (0gr.048 par k°)	15h.25	voie stomacale	15h.45 : l'animal vomit; aucun autre trouble apparent.
15.6.21	Ch. batardé ♂ 7k.500	7 cc.5 sol. à 5 °/° (0gr.05 par k°)	15h.30	»	15h.40 : phénomènes de parésie. 15h.55 : l'animal vomit. 16h.15 : station debout impossible, l'animal se couche, respiration lente (15 par minute). 16h.35 : respiration difficile. 17h.45 : l'animal réussit à se mettre debout, mais tient difficilement sur ses pattes. Le lendemain paraît complètement rétabli.
17.6.21	Même chien	5 cc. sol. à 5 °/° (0gr.033 par k°)	15h.35	inj. s/cutanée	17h.25 : l'animal marche difficilement ; il se couche. 18h. : essaye de se relever, fait quelques pas, les jambes à demi repliées, comme un chien qui avance dans une attitude craintive. 18h.3' : titube, se couche, urine abondamment. 18h.30 : l'animal est toujours couché, on quitte le laboratoire, le lendemain l'animal est retrouvé complètement rétabli.

V. — Expériences sur le Chien (*suite*).

Dates des Exp^ces	Poids et Sexe de l'animal	Titre et quantité de la solution administrée	Heures	Modes d' administration	RESULTATS et OBSERVATIONS.
21.6.21	Petit chien ♀ 4k.600	7 cc. sol. à 5 °/° (ogr.08 par k°)	14h.55	Voie stomacale	15h.35 : apparition des phénom. de parésie. 15h.45 : l'animal ne peut plus se tenir debout. 16h.20 : respiration saccadée. 16h.25 : phénom. asphyxiques ; mouvements de natation des pattes de devant, extension tonique des pattes postérieures; les phénomènes asphyxiques sont tels qu'on s'attend à voir l'animal mourir d'un instant à l'autre. 17h. : La respiration paraît reprendre, superficielle d'abord, puis plus profonde ; l'animal paraît endormi. 17h.30 : il répond aux appels par des mouvements de la queue. 17h.35 : il se remet debout. Le lendemain est complètement rétabli.
23.6.21	Même chien	9 cc. sol. à 5 °/° (ogr.10 par k°)	15h.	»	Mêmes phénomènes généraux que l'avant-veille. Mort à 16h.45.
25.6.21	Chien ♂ 7k.500	Sol. à 1 °/°			
		6 cc. »	16h.42	V.veineuse	Voir tracés I et II.
		5 cc. »	16h.53	»	
		5 cc. »	16h.59	»	
		10 cc. »	17h.10	»	
					La dose mortelle par la voie stomacale ou sous-cutanée est d'environ ogr.10 par k°. Par la voie veineuse elle est de 0.025 à ogr.03.

III

Tels sont les résultats expérimentaux fournis par l'étude toxicologique du Bromhydrate de Cicutine. J'ai déjà dit que mon but, dans ce travail, n'était pas de refaire l'étude de l'action pharmacodynamique proprement dite de la Cicutine ; toutefois j'ai profité des expériences relatives à la détermination du pouvoir toxique du Bromhydrate de cette base soit pour préciser certaines points de la symptomatologie de l'intoxication, soit pour enregistrer les modifications de pression produites par les doses de Bromhydrate de Cicutine que j'administrais au chien par la voie veineuse.

En ce qui concerne la symptomatologie de l'intoxication, je dois d'abord dire que je n'ai jamais observé chez le chien de phénomènes convulsifs proprement dits, permettant, comme l'ont fait quelques auteurs, un rapprochement quelconque entre la Cicutine et la Strychnine, et je pense, comme G. POUCHET, que les accidents convulsifs qui ont été observés au cours d'empoisonnements provoqués par les diverses variétés de Ciguë en nature sont dus, pour une part aux dérivés éthylés et surtout méthylés de la Conicine, et pour une part non moins importante à ces substances résinoïdes telles que la Cicutoxine ou l'œnanthotoxine dont il a signalé l'existence dans les racines du *Cicuta virosa* et de l'*Ænanthe Crocata*. Ce qui a pu aussi en imposer à certains auteurs pour des convulsions, ce sont les efforts, les mouvements *volontaires* que fait l'animal, à une certaine période de l'empoisonnement, pour se mettre debout : ses membres battent l'air à la recherche d'un sol qu'ils ne rencontrent pas, mais à aucun moment il n'y a de convulsions du type Strychnique, à aucun moment il n'y a de contracture spasmodique témoignant d'une augmentation de l'excitabilité des centres médullaires de l'ordre de celle qui se manifeste au cours de l'intoxication par la Strychnine.

Ce qui frappe aussi dans l'évolution de l'empoisonnement par la Cicutine, c'est la cessation brusque des phénomènes toxiques lorsque l'animal a pu franchir sans succomber la période des troubles asphyxiques. La Cicutine ne paraît pas se fixer énergiquement sur les éléments anatomiques qu'elle touche et elle paraît s'éliminer assez rapidement par le rein et par les divers appareils glandulaires. Il y a, en effet, pendant toute la période des troubles asphyxiques notamment, une abondante salivation et une abondante secrétion de mucus bronchique. Le fait est important au point de vue du pronostic des empoisonnements par la Cicutine. Dans ces empoisonnements, en effet, le danger provient avant tout des troubles respiratoires qui surviennent soit du fait d'une action du poison sur le bulbe, soit du fait de son action sur les nerfs moteurs de l'appareil mécanique de la respiration, et si, en pratiquant la respiration artificielle, on aide le sujet à franchir cette période critique, on lui donne le temps d'éliminer le poison et de se désintoxiquer. Jusqu'ici, les modifications produites par le Bromhy-

drate de Cicutine sur la circulation n'ont été étudiées, ou du moins enregistrées que par G. POUCHET, et pour des doses équivalentes à un milligr. par kilogr. d'animal. Il était donc intéressant de voir si avec des doses plus fortes l'allure générale du phénomène serait la même. Or, si l'on compare nos tracés à ceux qu'il a obtenus et reproduits dans son *Traité de Pharmacodynamie et de Matière Médicale* (5e série, p. 657 et suivantes), on constate que l'allure générale de ces tracés est la même : au début on observe une accélération des contractions cardiaques avec augmentation de tension et d'amplitude, qui ne tarde pas à être suivie d'un abaissement régulier et continu jusqu'au moment de la mort du cœur.

Avec les hautes doses on observe au début une période d'excitation qui se traduit par des palpitations précipitées. A noter enfin le fait qu'à un certain moment, lorsque l'animal a déjà reçu d'assez fortes doses de Cicutine, le cœur ne réagit pour ainsi dire plus à l'injection d'une nouvelle dose par une augmentation de pression et, qui mieux est, qu'il arrive un moment où l'injection d'une forte dose accentue encore la chute de pression qui annonce la mort prochaine du cœur.

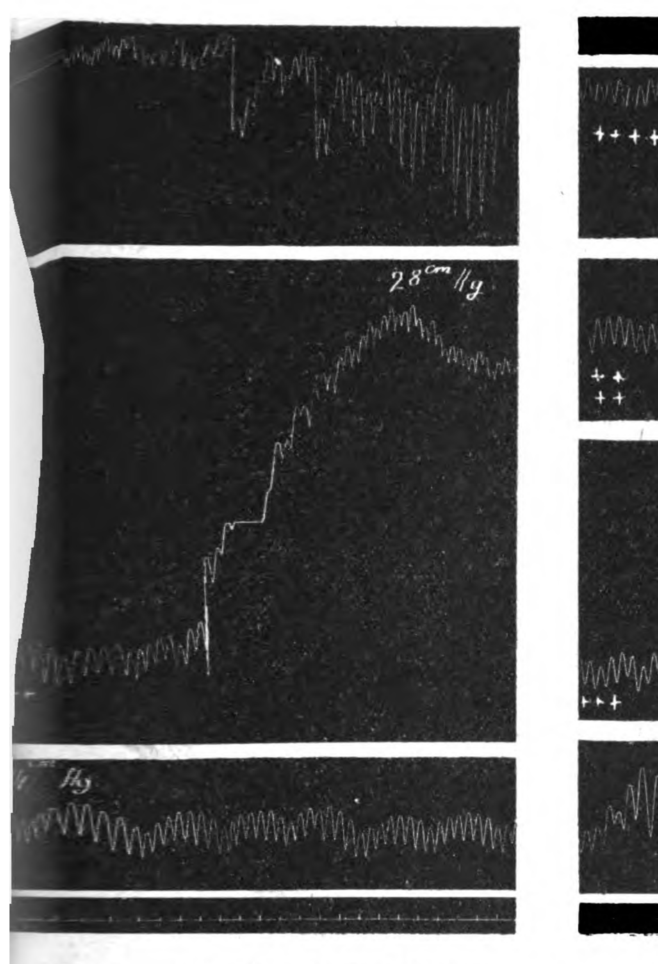


Fig. 1. — Chien ♂ 7 k. 500, chloralosé.

. — Tracé normal (16 h. 38').

I. — En + +, injection intraveineuse (saphène), de 0 gr. 06 Bromhydrate de cicutine (16 h. 42).

II. — Suite immédiate de II. Temps en secondes.

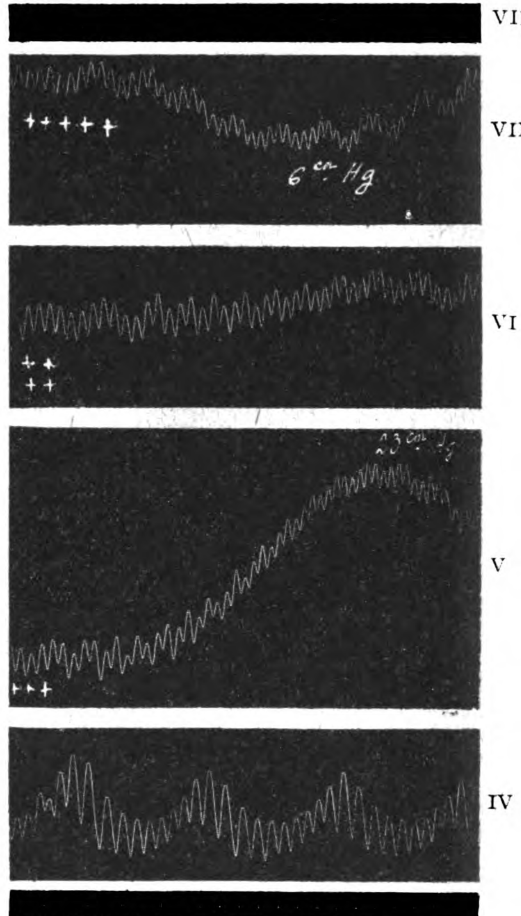


Fig. 2. — Suite de l'expérience.

IV. — 5' après la première injection.

V. — Nouvelle injection de 0 gr. 05, bromhydrate de cicutine (16 h. 53').

VI. — Nouvelle injection de 0 gr. 05, bromhydrate de cicutine (16 h. 59').

VII. — Injection de 0 gr. 10 bromhydrate de cicutine (17 h. 10').

VIII. — Mort du cœur (17 h. 25').

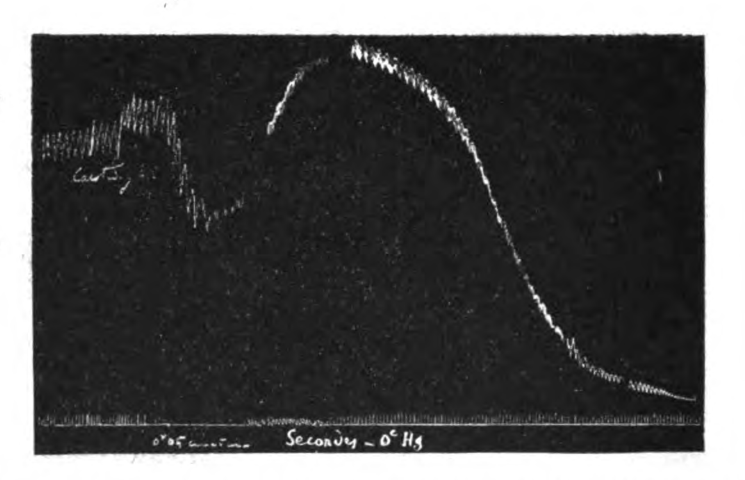


Fig. 3. — Chat ♀ 2 k. 300, endormi au mélange alcool, éther, chloroforme (1). Injection dans la jugulaire de 0 gr. 05 cicutine (bromhydrate).

(1) Cette expérience a été faite au laboratoire du professeur GLEY. L'animal avant l'injection de cicutine avait subi 3 excitations du N. Splanchnique.

IV

Posologie du Bromhydrate de Cicutine chez l'Homme

Abstraction faite de l'emploi de certaines préparations galéniques de Ciguë, de l'emplâtre notamment, à titre d'analgésiques périphériques, les applications de la Cicutine ou de ses sels ont été jusqu'ici peu nombreuses. Ils ont été fort en honneur cependant à une certaine époque, et préconisés dans le traitement de toute une série d'affections ou de symptômes : l'asthme, la coqueluche, le toux spasmodique, le priapisme, diverses affections nerveuses, voire la phtisie pulmonaire.

Ces médicaments n'en étaient pas moins à peu près oubliés lorsque, tout récemment, le Professeur P. Marie a de nouveau attiré l'attention des médecins sur les bons effets qu'il avait obtenus de l'emploi du Bromhydrate de Cicutine dans le traitement des myoclonies et spécialement des myoclonies consécutives à l'encéphalite léthargique (1). L'idée, en effet, est très logique de s'adresser pour le traitement des troubles neuro-musculaires, raideurs parkinsoniennes et myoclonies à une substance qui, par son action sur les terminaisons motrices, soit susceptible d'atténuer ou même de supprimer les secousses myocloniques en empêchant la perception par les muscles des excitations anormales et permanentes transmises par les centres. Or, parmi les substances médicamenteuses douées de semblable propriété, les mieux étudiées sont le Curare et la Cicutine. Sans doute l'action de la Cicutine, à ce point de vue, est loin d'être aussi spécifique et aussi radicale que celle du Curare, mais la Cicutine a l'avantage d'être beaucoup plus maniable et infiniment moins dangereuse. Ainsi que je l'ai dit au début même de ce travail, et pour les raisons que j'ai longuement développées dans la suite, pendant longtemps la Cicutine a été considérée comme un poison redoutable, et les thérapeutes, par une interprétation peut-être un peu superficielle d'expériences anciennes sur la toxicité de cet alcaloïde, ont fixé la posologie du Bromhydrate de Cicutine à des doses voisines du milligramme ou du centigramme tout au plus.

C'est naturellement en s'inspirant de ces données jusqu'ici classiques, qu'en thérapeutes prudents, et il faut les en louer, Pierre Marie et H. Bouttien ont expérimenté le Bromhydrate de Cicutine dans le traitement des myoclonies. A la suite de leur communication beaucoup de médecins essayèrent à leur tour l'emploi de ce sel dans le le traitement des mêmes accidents, et le Professeur agrégé Guillain fut le premier, à la Charité, à l'employer. Déjà, à ce moment, mes

---

(1) Pierre Marie et H. Bouttier. *Bulletins et Mémoires de la Société Médicale des Hôpitaux*, 3e série, n° 7, 3 mars 1921, p. 252.

recherches sur la toxicité du Bromhydrate de Cicutine étaient assez avancées pour que je me considérasse comme autorisé à demander à M. GUILLAIN de vouloir bien essayer d'administrer le médicament à des doses un peu supérieures à celles que le Professeur PIERRE MARIE et H. BOUTTIER avaient employées. Et c'est ainsi qu'avec une grande timidé d'abord et en augmentant les doses très progressivement, nous pûmes administrer à certains malades jusqu'à 0gr.04 (quatre centigrammes) de Bromhydrate de Cicutine par la voie sous-cutanée.

M. le Dr GUILLAIN n'eut pas, dans la suite, d'autres malades susceptibles de bénéficier du traitement cicuté, mais M. le Dr TIXIER, ayant eu à son tour l'occasion de l'appliquer à quelques malades, je n'hésitais pas, en m'appuyant sur l'expérience acquise, à lui demander d'administrer d'emblée 0gr.05 (cinq centigrammes) de Bromhydrate de Cicutine. Les malades supportèrent admirablement cette dose.

Les résultats obtenus chez les Parkinsoniens furent de l'ordre de ceux qu'avaient observés PIERRE MARIE et H. BOUTTIER, mais plus marqués peut-être contre les manifestations douloureuses que contre les manifestations motrices proprement dites. C'est que le Bromhydrate de Cicutine, en effet, ne limite pas son action aux nerfs moteurs ; il atteint aussi le domaine sensitif, et il convient de rappeler l'unanimité des vieux médecins touchant l'action antidouloureuse locale et générale de la Ciguë, et que STŒRCK résumait en deux mots toutes les propriétés de la Ciguë : « Dolores sedat ».

Il était donc légitime d'essayer l'emploi du Bromhydrate de Cicutine dans d'autres affections que les myoclonies, dans des affections où les phénomènes douloureux occupent en quelque sorte la première place, et c'est ce qui fut fait.

Nos observations sont encore trop peu nombreuses pour qu'il nous soit possible d'en tirer des conclusions définitives au point de vue de la valeur réelle du Bromhydrate de Cicutine à titre d'analgésique dans les diverses affections où il pourrait être utilisé à ce titre. C'est là un point sur lequel nous pourrons sans doute revenir un peu plus tard. Le seul fait qu'il importe ici de faire ressortir parce qu'il peut devenir le point de départ de nouvelles recherches sur les indications thérapeutiques du médicament, c'est que l'on peut sans inconvénients administrer à l'homme des doses bien supérieures à celles qui ont été utilisées jusqu'ici. Nous avons pu injecter sous la peau, en une seule fois et sans le moindre incident 0gr.10 (dix centigrammes) de Bromhydrate de Cicutine et en deux fois dans la journée 0gr.15 (quinze centigrammes). Notre dernière observation, la seule que nous résumerons ici, est celle d'une femme à qui nous avons injecté en une seule fois 0gr.16 (seize centigrammes) du sel.

Cette dernière dose ayant déterminé quelques petits signes d'intolérance, nous n'avons pas cru devoir, au moins chez cette malade, dépasser cette dose. Voici cette observation.

Madame C.., 38 ans. Lit n°15. Salle Gosselin. Coxalgie gauche, avec douleurs à type de sciatique, à paroxysmes surtout nocturnes.

Jusqu'au 9 Juin la malade prenait alternativement de l'aspirine et de l'extrait de thébaïque; on avait même dû lui faire deux ou trois piqures de pantopon.

Le 9 juin : Suppression de tous les autres médicaments et administration par voie sous-cutanée de 0gr.05 de Bromhydrate de Cicutine.

La malade a beaucoup moins souffert que les jours précédents.

Les 10-11-12 juin on refait chaque jour une injection de 0gr,05 de Bromhydrate de Cicutine. Le 10 juin la malade est encore calmée ; le 11 et le 12 juin l'action est nulle et on doit redonner de l'aspirine. Aucun signe d'intolérance, pas de modifications du pouls qui reste à 70-80. Un litre à un litre et demi d'urines normales. La tension artérielle qui était à 11,5 maxima, minima 7, s'est élevée à 13,5 et 9, et reste élevée.

Les 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 juin : 0gr.10 (dix centigrammes) par jour de Bromhydrate de Cicutine. Action nulle sur les douleurs, mais aucun signe d'intolérance.

Le 20 juin : 0gr,16 (seize centigrammes) de Bromhydrate de Cicutine. Aussitôt après la piqure : vertiges, brouillard devant les yeux, quelques nausées, légère tendance syncopale.

Le 21 juin : Mêmes phénomènes après une piqure de 0gr,16 (seize centigrammes). Aucune action sur les douleurs.

Au point de vue Chimio-thérapeutique cette observation pourrait être diversement interprêtée ; elle ne plaide pas, il faut le reconnaître, en faveur d'une action analgésique très remarquable du Bromhydrate de Cicutine ou tout au moins des fortes doses de ce sel ; mais, du moins, démontre-t-elle avec la dernière évidence la très grande tolérance de l'organisme pour un composé qu'on était habitué jusqu'ici à considérer presque comme un poison redoutable. Voici en définitive une femme qui du 9 au 22 juin a reçu en injections sous-cutanées 1gr.22 de Bromhydrate de Cicutine et qui n'a manifesté de phénomènes d'intolérance, d'ailleurs assez légers, que le jour où, d'emblée, on lui a administré 0gr.16 (seize centigrammes) de ce sel.

Il est vraisemblable que ces signes d'intolérance ne se seraient même pas manifestés si on lui avait administré cette dose en deux fois, à quelques heures d'intervalle. C'est donc bien que, ainsi que nous l'avions déduit de nos expériences sur le chien, le Bromhydrate de Cicutine n'imprègne pas profondément les éléments anatomiques sur lesquels il se porte et qu'il est assez rapidement éliminé par les divers émonctoires que nous avons énumérés.

Les doses de Bromhydrate de Cicutine indiquées dans la plupart des formulaires comme doses thérapeutiques sont donc manifestement, du point de vue toxicologique, des doses très faibles, très éloignées de celles qu'on peut administrer aux malades sans leur faire courir le moindre danger, ces dernières pouvant atteindre 0gr.10 à 0gr.15.

Cela ne veut pas dire qu'il y ait intérêt, au point de vue du résultat thérapeutique à atteindre, à utiliser systématiquement ces hautes doses : cela veut simplement dire que l'on peut, éventuellement, y avoir recours après avoir tâté, comme cela est de règle, la susceptibilité des malades. Dans tous les cas il est recommandable de procéder

par doses réfractées : 0gr.04 à 0gr.05 répétées au besoin deux ou trois fois dans la journée.

Il y aurait certainement un grand intérêt à poursuivre méthodiquement l'étude des propriétés thérapeutiques du Bromhydrate de Cicutine, administré à différentes doses, tant dans les affections caractérisées par des troubles moteurs de l'ordre de ceux qu'on observe chez les Parkinsoniens que dans celles où l'élément douleur est prédominant, car, si l'étude pharmacodynamique de telle ou telle substance médicamenteuse permet de prévoir les troubles fonctionnels contre lesquels cette substance peut légitimement et logiquement être utilisée, c'est la clinique seule qui, le plus souvent, peut confirmer ou infirmer les indications déduites de l'étude pharmacodynamique et fixer définitivement la valeur thérapeutique réelle d'un médicament.

PHARMACOLOGICAL DEPT. UNIVERSITY COLLEGE LONDON.
DIRECTOR : PROFESSOR A. J. CLARK.

The action of Potassium and Calcium upon the isolated Uterus

BY

G. TATE and A. J. CLARK.

The following experiments were undertaken to determine the mode of action of potassium and calcium upon the isolated uterus and to ascertain what effect alterations in the concentrations of these ions had upon the response of the uterus to drugs.

DESCRIPTION OF EXPERIMENTS.

The isolated uteri were suspended in a bath of oxygenated Ringer and the movements were recorded by levers which magnified the excursion about four times. The Ringer employed had the following composition NaCl 0.92 %; KCl 0.042 %; $CaCl_2$ (anhydr.) 0.012 %; $NaHCO_3$; 0.016 %; PH 8.0.

Uteri of guinea pigs, rats, rabbits and kittens were used ; the uteri were from virgin animals in all cases.

The concentrations of drugs used were unless otherwise stated in all cases just insufficient to produce a maximal effect, if employed alone.

The action of potassium and calcium upon the various uteri is shown in Table 1, together with the action of a number of drugs.

MATHISON (1) first showed that excess of potassium produced contraction of the uterus, and this result has been confirmed by various observers SPAETH (2), HANKE and KOESSLER (3) and SOREF(4)

We found that the response of the uteri of different guinea pigs to potassium varied considerably, and that the concentration required to produce the same submaximal contraction varied in different animals from 0.038 % KCl to 0.08 %. This fact is important if it is desired to use KCl as a standard of comparison in testing uterine drugs.

The uteri of all species of animals tested responded by contraction to both excess and lack of KCl. We also found that alteration of the reaction of Ringer, either towards alkalinity or acidity both caused contraction of the guinea pig's uterus. DALE (15) showed that an increase in the osmotic pressure of about 20 % annulled the response of the guinea pig's uterus to stimulant drugs, and that a decrease of osmotic pressure of about 20 % excited contractions, and antagonised the inhibitor effect of adrenalin.

The effect of excess of calcium varied in different uteri ; in the guinea pig and the rat excess of calcium ($CaCl_2$ content of Ringer increased from 0.012 to 0.035 %) produced relaxation, whereas in the rabbit and the cat excess of calcium caused contraction.

Changing from excess of calcium back to normal Ringer always caused excitation in the guinea pig's uterus.

Ringer containing no calcium caused a rapid cessation of activity in the uteri of all species.

The effects obtained with adrenalin and ergamin agree with the result of previous workers (GUNN AND GUNN (6), SUGIMOTO (7). COW (8), showed that preliminary treatment of the uterus of a guinea pig or cat with pituitary extract caused adrenalin to produce a contraction instead of the normal inhibitory effect. We found that repeated doses of either ergot or pituitary extract brought the uterus of the guinea pig into a hyperexcitable state in which it responded by contraction to adrenalin.

DALE and DIXON (9) and BRY (10) found that the action of tyramine was the same as that of adrenalin. We found that tyramine was more liable to produce contraction in the guinea pig's uterus than was adrenalin.

The action of tyramine on the kitten was found to be variable; in some cases it produced inhibition, but in other cases it caused

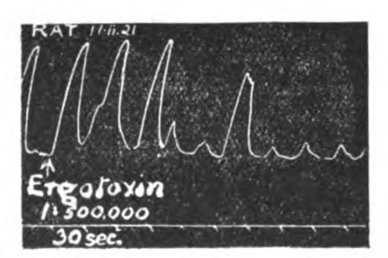


Figure 1. — Action of Ergotoxin on Uterus of Rat.

contraction, although adrenalin caused relaxation in these latter cases.

Ergotoxin is supposed to produce contractions of the isolated uterus, but BARGER and DALE (11) found that it had little action on

the uterus of a virgin cat, and DALE(12) showed that it produced relaxation of the uterus of a ferret. We found that only in the rabbit did it produce a constant contraction. Ergotoxin produced marked inhibition in the rat's uterus as is shown in figure 1.

The action of potassium in antagonising the action of drugs.

Potassium and calcium produce antagonistic effects in the uteri of the rat and the guinea pig, and in these cases the two ions antagonise each other as is shown in figure 2. The action of potassium is stronger than that of calcium in these cases, for antagonism is only

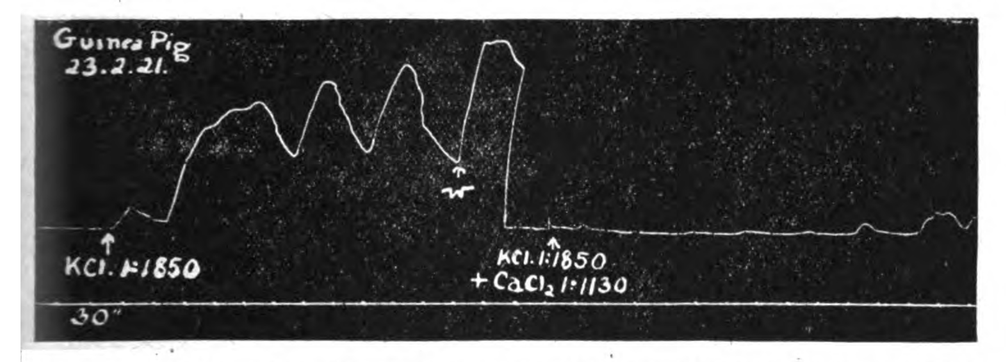


Figure 2. — Antagonistic action of potassium and calcium upon the uterus of the guinea pig.

obtained when the two salts are added together, and if the potassium is added first and a contraction started, then the addition of calcium does not inhibit this contraction but actually augments it (figure 3).

Calcium and potassium both cause contraction in the uteri of the

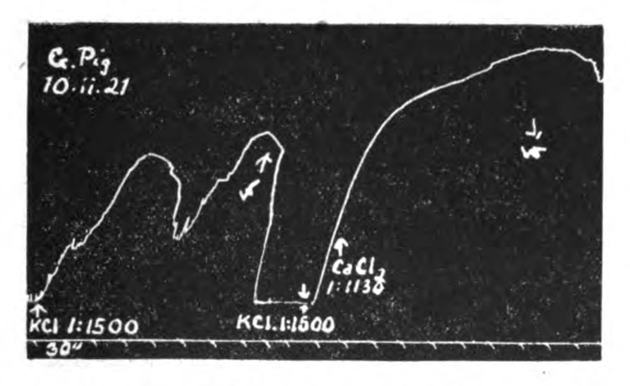


Figure 3. – The failure of calcium to antagonise potassium when the calcium is added subsequently to the potassium (uterus of guinea pig).

rabbit and the cat and in these cases the two ions do not antagonise each other but produce an additive effect

The action of potassium in antagonising drugs is shown in table II.

Potassium antagonises the action of all drugs that normally produce relaxation : it is particularly interesting to note that the addition of potassium abolishes the action of ergamine in the rat, where this drug produces relaxation. The action of potassium in antagonising adrenalin in the rat's uterus is shown in figure 4.

The action of calcium in antagonising the action of drugs.

The action of calcium in antagonising the action of drugs is shown in table III. Excess of calcium has the same action as adrenalin in the rat, rabbit and guinea pig, but it has the opposite action in the kitten.

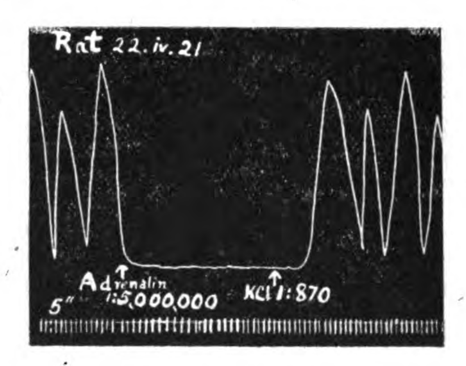


Figure 4. — The antagonism of adrenalin by potassium in the uterus of the rat.

Calcium can antagonise the action of adrenalin in the kitten as is shown in figure 5. Excess of calcium also will antagonise the action of adrenalin and tyramine and ergotoxin in the hyperexcitable guinea pig's uterus, when these drugs produce contraction instead of

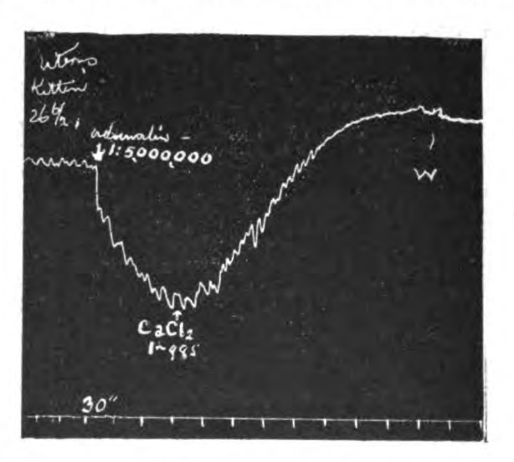


Figure 5. — The antagonism of adrenalin by calcium in the uterus of the kitten.

relaxation. Consequently excess of calcium antagonises the action of extract of ergot in the guinea pig's uterus as is shown in figure 6.

Calcium excess cannot antagonise the action of ergamine in the guinea pig (figure 6), nor can it antagonise the action of pituitary extract in either the guinea pig or the rat.

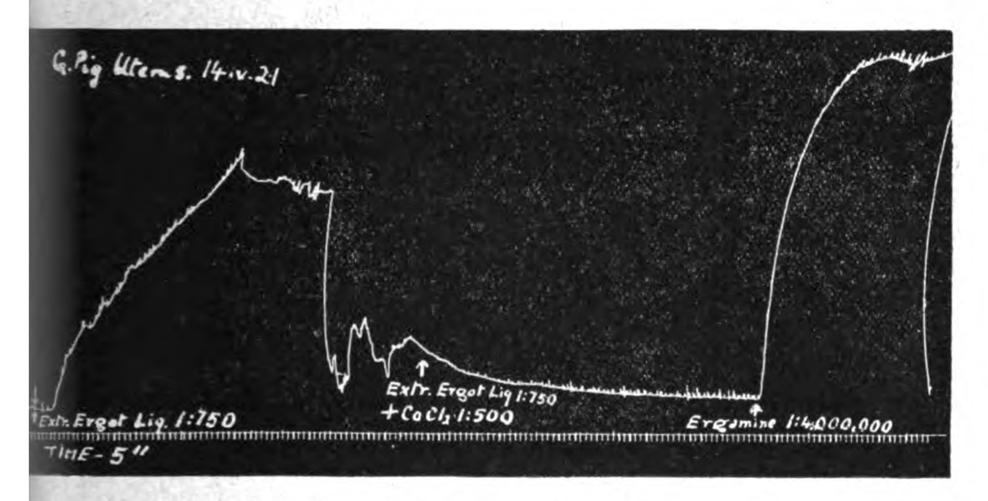


Figure 6. — The antagonism of ergot by calcium in the uterus of the guinea pig, and the failure of calcium to antagonise ergamine.

Discussion.

The mode of action of potassium and calcium.

Calcium and potassium act as antagonists in the heart, and also on developing eggs etc., and it is interesting to note that although they act as antagonists in the uteri of the guinea pig and rat, yet they produce a similar action in the cat and rabbit, and here there is no evidence of any antagonism.

The way in which these two ions influence the action of drugs indicates that they act at different points in the neuro-muscular mechanism. Potassium produces contractions in all uteri and it can antagonise the action of all inhibitor drugs, and therefore it must be supposed to act upon the muscle directly.

The action of excess of calcium differs in different uteri, and although calcium can inhibit the action of adrenalin in the uterus of the kitten, yet it cannot antagonise the action of ergamine. This suggests that calcium acts upon the nerve endings.

The action of calcium is similar to that of adrenaline in all cases except the kitten : but here they have opposite actions.

Earlier experiments suggested that the action of potassium

might resemble that of histamine but here also there is one instance in which they have opposing actions namely the uterus of the rat.

The mode of action of pituitary extract.

Pituitary extract acts like potassium, and causes contraction in all species of uteri : this contraction is not inhibited by excess of calcium in either the rat or the guinea pig.

The action of pituitary appears therefore to be on the muscle cells directly, and it resembles the action of potassium.

The relative effects produced by potassium and pituitary extract are shown in figure 7.

The amount of potassium required to produce a just submaximal

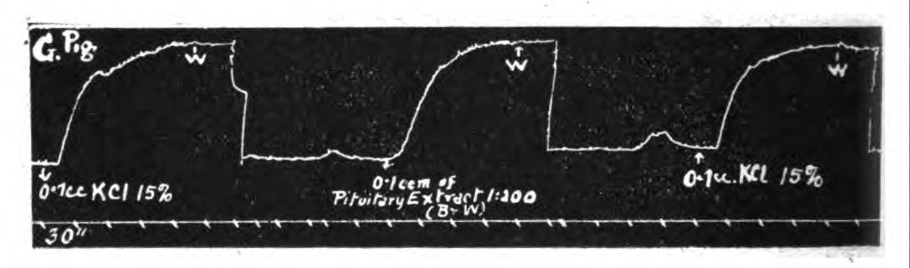


Figure 7. — The comparative actions of potassium and pituitary extract in the uterus of the guinea pig.

contraction was found to vary in different guinea pigs, the amounts necessary varying from 0.03 to 0.08 %; similarly the minimal effective dose of pituitary extract was found to vary, but fortunately the sensitivity to pituitary extract was found to vary in the same manner as did the sensitivity to potassium. Potassium can therefore be used as a standard by which to estimate the strength of preparations of pituitary extract. The equivalent concentrations are KCl 0.025 % and pituitary extract (B. and W.) 0.0008 %.

The action of potassium and pituitary extract is not identical for calcium can antagonise the action of potassium in the rat and the guinea pig, but does not antagonise the action of pituitary extract.

The contraction produced by pituitary extract in the guinea pig is a more powerful one than that produced by potassium, as can be demonstrated by weighting the lever ; this effect is shown in figure 8 the two substances caused a nearly equal effect upon the unweighted uterus, but, when a weight was added, the potassium only caused a short contraction while the pituitary extract produced a prolonged contraction.

The mode of action of ergot.

The same specimen of liquid extract of ergot was used in all cases. The extract always caused contraction in the uterus of the guinea pig and relaxation in the uterus of the rat. This action would corres-

pond to the action of ergamine, but as is shown in figure 6, excess of calcium inhibits the action of ergot upon the guinea pig's uterus, but does not inhibit the action of ergamine. We found that ergotoxin and tyramine produced no action or else relaxation in the fresh uterus of the guinea pig, but that these drugs regularly produced contraction in guinea pig's uteri, which had been rendered excitable by the application of drugs, and that this action was inhibited by administration of excess of calcium.

These results suggest that the action of liquid extract of ergot is due to its ergotoxin content, but that there is some other constituent present which causes the ergotoxine to produce contraction in the guinea pig's uterus, and makes the fresh uterus react like the hyperexcitable uterus.

These experiments make it very difficult to assign any site of action for ergamine; ergamine cannot act upon the muscle cells in the same manner as do potassium and pituitrin, because it produces the opposite effect in the rat's uterus. Ergamine acts differently from adrenalin in the guinea pig's and kitten's uteri and also its action is not antagonised by calcium as is the action of adrenalin. To explain these results by nerve ending substances it is necessary to assume at least three sites of action namely(1) site of action of adrenalin, tyramine, ergotoxin and calcium(2) site of action of ergamine and(3) site of action of potassium and pituitrin.

This scheme will not really explain the actions observed, for calcium acts in a manner different from adrenalin in the kitten's uterus, although the two substances have the same action in the rat, rabbit, and guinea pig. We have been quite unable to explain our results by any reasonably simple scheme of specific nerve ending substances.

The standardisation of pituitary extract and ergot.

Our results show that potassium and pituitary extract act in an almost identical manner upon all uteri investigated, whereas there are marked differences in the action of pituitary extract and ergamine : it appears therefore more rational to standardise pituitary extract against potassium than against ergamine.

One of us (13) has shown that the addition of equal volumes of 15 % KCl, and of 0.5 % standard pituitary extract, produce an approximately equal effect upon the isolated guinea pig's uterus. The addition of 0.1 ccm. of either to a bath of 60 cc produces a submaximal contraction.

The standardisation of ergot is a more difficult matter (fig. 7).

The three constituents of ergot, ergotoxine, tyramine and ergamine, all produce contraction in the rabbit's uterus and relaxation in the rat's uterus, but the different constituents produce opposing effects in the uteri of the guinea pig and car.

The reaction of the rabbit's uterus is sluggish, and quantitative comparisons are difficult, and it is still more difficult to make quantitative comparisons of the inhibitory effects produced in the rat

The guinea pig's uterus is therefore most convenient for standardisation, but if this uterus is used it is most important to employ a Ringer of standard composition, for an excess of calcium will inhibit the action of ergot, but will not affect the action of pituitary extract

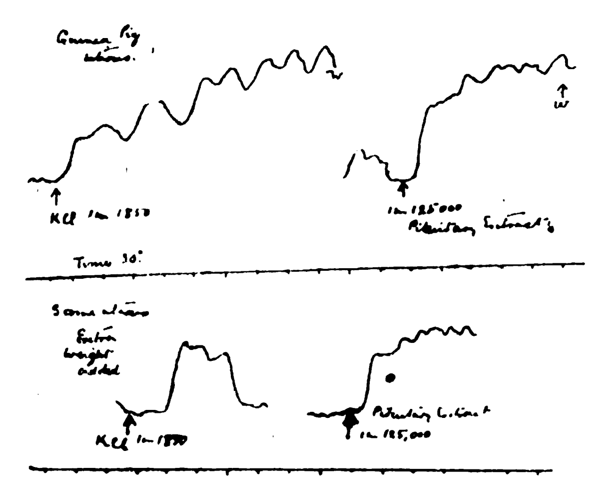


Figure 8. — The action of potassium and pituitary extract upon the uterus of the guinea pig : (1) when the uterus is not loaded, and (2) when the uterus is lifting a weight.

or ergamine. Variations in the calcium content will therefore produce very large errors in standardisation.

When a guinea pig's uterus is used to standardise ergot, the first two or three responses should be disregarded, as the response of the uterus is variable until it has become hypersensitive. The administration of a preliminary dose of pituitrin is a simple method of rendering a guinea pig's uterus hypersensitive.

Summary.

(1) Potassium chloride produces contraction in the uteri of the rat, guinea pig, rabbit ant cat.

(2) Calcium chloride produces contraction in the uteri of the rabbit and cat, and relaxation in the uteri of the guinea pig and rat.

(3) Potassium and calcium act as antagonists in the uteri of the guinea pig and rat, but do not do so in the rabbit and cat.

(4) Potassium appears to act upon the muscle, and its action in general resembles that of pituitary extract.

(5) Calcium appears to act upon nerve endings, and its action shows some resemblance to that of adrenalin and tyramine.

(6) Ergamine differs from potassium and pituitary extract in that it produces relaxation in the uterus of the rat, this relaxation is inhibited by potassium. Calcium does not antagonise the contraction produced by ergamine in the rabbit and in the cat. Ergamine appears to act intermediately between the nerve ending and the muscle cell.

REFERENCES.

(1) MATHISON, *Journ. of Physiol.* XLII, 471, 1911.
(2) SPAETH *U. S. A. Public Health Bull.* 115, 1918.
(3) HANKE and KOESSLER, *Journ. of Biol. Chem.*, XLIII, 579, 1920.
(4) SOREF *Journ. of Physiol.*, LIV, 1921, *Proc. Phys. Soc.*, 83.
(5) DALE *Journ. of Physiol.*, XLVI, 1913, *Proc. Phys. Soc.*, 19.
(6) GUNNAND GUNN, *Journ. of Pharm. and Exp. Ther. V.*, 527, 1913.
(7) SUGIMOTO, *Arch. f. Exp. Path. u. Pharm.*, LXXIV, 27, 1913.
(8) COW, *Journ. of Physiol.*, LII, 301, 1919.
(9) DALE and DIXON, *Journ. of Physiol.*, XXXIX, 25, 1909.
(10) BRY, *Zeit. f. Exp. Path. u. Ther.*, XVI, 186, 1914.
(11) BARGER and DALE, *Journ. of Physiol.*, XL, 1910, *Proc. Phys. Soc.*, 38.
(12) DALE, *Journ. of Physiol.*, XLVI, 291, 1913.
(13) TATE, *Pharm. Journ. and Pharm.*, 2999, 268, 1921.

Drug.	Rat.		Guinea Pig.		Rabbit		Kitten	
	Dose.	Result.	Dose.	Result.	Dose.	Result.	Dose.	Result.
Excess KCl.	1 in 666	+	1 in 1.850	+	1 in 2.000	+	1 in 1.000	+
Lack of KCl.		+		+		+		+
Excess $CaCl_2$.	1 in 550	—	1 in 1.132	—	1 in 2.000	+	1 in 2.000	+
Adrenalin	1 in 10.000.000	—	1 in 10.000.000	—	1 in 5.000.000	+	1 in 10.000.000	—
Pituitary Extr.	1 in 60.000	+	1 in 125.000	+	1 in 100.000	+	1 in 100.000	+
Tyramin.	1 in 60.000	—	1 in 100.000	— or nil	1 in 100.000	+	1 in 100,000 1 in 60.000	+ or —
Ergotoxin.	1 in 500.000	—	1 in 1.800.000 1 in 900.000	— or nil	1 in 500.000	+	1 in 500.000	nil or +
Ext. Ergot Liq.	1 in 300	—	1 in 4.000	+		+	1 in 2.500	+

(In this and subsequent tables + indicates contraction and — indicates inhibition).

A) Action of KCl. in antagonising $CaCl_2$.

	Guinea Pig.		Rat.		Result	Rabbit.		Kitten		Result.
	$CaCl_2$	KCl	$CaCl_2$	KCl		$CaCl_2$	KCl	$CaCl_2$	KCl.	
Action of $CaCl_2$ alone.	1 in 1.132		1 in 550		—	1 in 2.000		1 in 2.000		+
Action of KCl alone.		1 in 1.850		1 in 666	+		1 in 2000		1 in 1000	+
Action of KCl. + $CaCl_2$.	1 in 1.132	1 in 1.850	1 in 550	1 in 666	0 or +	1 in 2000	1 in 2000	1 in 2000	1 in 2000	++

B) Action of KCl. in antagonising drugs.

	Guinea Pig & Rat			Rat.			Guinea Pig & Rat.			Guinea Pig & Rat.		
	Adrenal.	KCl.	Result.	Ergam.	KCl.	Result	Tyram.	KCl.	Result	Ergotox.	KCl.	Result
Action of drug alone.	1 in 10.000.000		—	1 in 1.000.000 1 in 400.000		—	1 in 100.000		—	1 in 900.000 1 in 500.000		—
Action of KCl.		1 in 870	+		1 in 660	+		1 in 869	+		1 in 870	+
Action of drug + KCl.	1 in 10.000.000	1 in 870	+	1 in 1.000.000	1 in 660	+	1 in 100.000	1 in 869	+	1 in 900.000	1 in 870	+

TABLE III.

Action of $CaCl_2$ in antagonising drugs.

	Guinea Pig.		Rat.		Result.	Guinea Pig.			Kitten.		
	Pituitrin	$CaCl_2$	Pituitrin	$CaCl_2$		Ergamine	$CaCl_2$	Result	Adrenal.	$CaCl_2$	Result
Action of Drug alone.	1 in 120.000		1 in 60.000		+	1 in 4.000.000		+	1 in 5.000.000		—
Action of $CaCl_2$ alone.		1 in 1.132		1 in 759	—		1 in 1.132	—		1 in 985	+
Action of Drug. + $CaCl_2$.	1 in 120.000	1 in 1.132	1 in 60.000	1 in 759	+	1 in 4.000.000	1 in 1.132	+	1 in 5.000.000	1 in 985	+

From the Physiological Laboratory, South Kensington.
Director: Professor A. D. Waller.

EXPERIMENTS WITH COCAINE

BY

W. BURRIDGE, M. A., M. B.

The effects of the systemic administration of cocaine on animals and man have been studied by v. Anrep (1) and Bose (2) respectively. The drug is a general protoplasmic poison affecting primarily the central nervous system and producing there a descending stimulation and paralysis, the centres first stimulated being also the first to be depressed. Therapeutically it finds two applications, a tonic in small amounts and a local anaesthetic in large.

A drug should not find therapeutic application as a tonic, however, unless its stimulating action can be isolated, for if its stimulation be automatically followed by depression the last state of the sufferer might be worse than the first. Clinical experience, the ergograph (16), and the well-know beneficial effect on fatigue following on the chewing of coca-leaves indicate the possibility of such isolation while the very wide gap between the amounts used as a tonic and the amounts used for local anaesthesia suggests that two differing mechanisms are responsible for the different effects. To obtain further knowledge on these points I have performed experiments on the action of cocaine on the heart. Previous work done on this organ gives relatively little information on the points at issue.

Mosso (15) using Roy's heart apparatus and blood as the perfusing medius found that cocaine increased the rate of heart beat both during and after its use, whereas Weiler (17) using William's frog-heart apparatus and dilute blood as the perfusing fluid found that the drug slowed and increased the size of the contractions somewhat as did strophanthus. Crile (11) noticed an increased rate of beat after injection of cocaine into the circulation and considered it to be due to a removal of vagal influence. He found also that cocaine enfeebled the frog's heart in diastole as did v. Anrep (1) and many others.

Method of Experiment. The present experiments have been carried out on the hearts of Rana Temporaria perfused *in situ* through the inferior vena cava. All perfusing solutions contained 0.6 %

NaCl, 0.03 % KCl, and 0.01 % $NaHCO_3$, but their calcium content was varied. The hydrochloride of cocaine was the preparation used.

The Stimulating Action of Cocaine. Coca leaves have been chewed from time immemorial by the natives of S. America to relieve fatigue and to produce that psychic stimulation sought by cocaine devotees. I find I can isolate a stimulating and recuperative action of cocaine on the perfused heart and give examples in the accompanying tracings (See fig. 1).

On the left of the first tracing are recorded the beats of a heart that was failing. The addition of a trace of cocaine to the perfusing fluid stopped the failure and effected a restoration which was succeeded by further failure when the perfusing fluid without cocaine was used again.

The heart from which tracing B was obtained was in a state of failure at the time the recorded experiment was begun and a very small trace of cocaine is seen the have produced a great increase in the height of the contractions. The improvement passed away when a cocaine-free solution was again perfused. After the events shown the cocaine solution was perfused once more and produced an equal improvement which was on this occasion maintained unchanged for a period over one hour.

The next tracing C records the activity of a heart which was beating well and then beat better when cocaine was a constituent of the perfusing fluid. Tracing D shows no action from cocaine.

Tracing E also shows a heart beating better as a result of the beneficial action of cocaine.

Hearts perfused with the solutions used in A, B and E above cease activity on that solution about one hour after the commencement of perfusion, whereas the addition of traces of cocaine shown

Variations in the action of cocaine are recorded in the accompanying table.

Strength of Cocaine Hydrochloride	Calcium content of perfusing solution	Action
1 in 1,000,000	0.0025 % $CaCl_2$	Depresses slightly
do	Saturation wich dibasic phosphate	Stimulates.
do	0.015 % $CaCl_2$	Stimulates slightly.
1 in 10,000,000	0.0025 % $CaCl_2$	Stimulates.
do	Saturation wich dibasic phosphate	Stimulates slightly.
do	0.015 % $CaCl_2$	No action.
1 in 100,000,000	0.0025 % $CaCl_2$	Stimulates.
do	Saturation wich dibasic phosphate, or 0.015 % $CaCl_2$	No action.
1 in 1,000,000,000	0.0025 % $CaCl_2$	Stimulates.

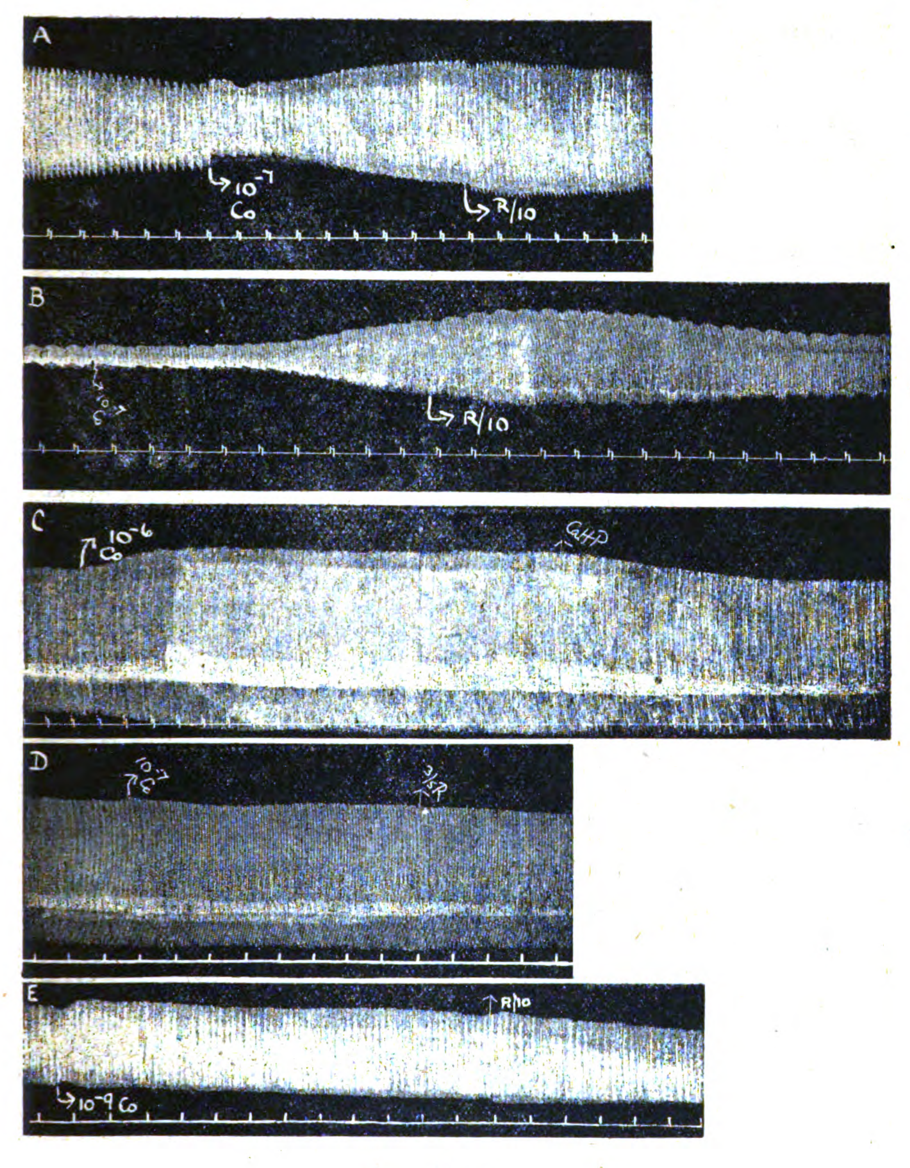


Fig. 1.

Fig. I. A — The perfusing solutions contained :
0.6 % NaCl, 0.03 % KCl, 0.01 % $NaHCO_3$, 0.0025 % $CaCl_2$.

At ↑ Co 10^{-7} this solution modified by the addition of one part of cocaine hydrochloride in ten millions was perfused.

At ↑ R/10 the original solution without cocaine again perfused.

For origin of the waves see BURRIDGE (5).

Fig. I. B Notation as *I. A.*

Fig. I. C — Differences from I. A and B.

(a) Perfusing solution was saturated with the dibasic phosphate of calcium = CaHP. (b) Strength of cocaine used, one part in one million = 10^{-6} Co.

Fig. I. D — The perfusing solution contained 0.015 % CaCl2 = 3/5 R. Strength of cocaine used, one part in ten millions = 10^{-7} Co.

Fig. I. E — 10^{-9} Co = one part of cocaine in 1,000,000,000.

prolonged their capacity for good activity to three or four hours. Hence I conclude that the stimulating and recuperative action of cocaine is real and that depression is not its necessary sequel.

A definite amount of cardiac action cannot, however, be associated with a definite strenght of cocaine, for a strength of cocaine depressing the heart under one set of conditions can stimulate or produce no effect under others. The variations of action observed in these experiments followed on variations in the calcium content of the perfusing solution and may, thus, be accounted for, in part at least, as a result of loss of some antagonism of sodium and potassium. I did not find, however, that the heart perfused with a Ringer's solution of the more usual calcium content was rendered more sensitive to the action of cocaine by increasing the sodium or potassium, so that I conclude diminution of the calcium content of the perfusing solution to be the factor determining this sensitisation of the heart to cocaine.

The actions of the anaesthetics (8), adrenalin (9), sodium bromide (10) and indeed all drugs with which I have experimented that affect the heart are also modified by varying the calcium content of the perfusing solution. Such modifications cannot, then, be consequent on interactions taking place between calcium and drug in the perfusing solution because calcium does not react with many of them. The modifications must, then, be indirect and consequent on changes wrought by the perfusing solution in the reacting organ. It would appear, therefore, that a diminution of the calcium associated with the cardiac tissues produce an increased susceptibility of the heart to the action of cocaine.

I have also shown elsewhere that the heart can be constrained to behave in many respects similarly to skeletal muscle and that the conditions of constraint show that differing capacities to adsorb different constituents of a common environment to be important factors determining the behaviour of an excitable tissue (4). Unless, therefore, we make the assumption that the excitation process in one excitable tissue differs fundamentally from the excitation process in another, these experiments on the conditions determining the susceptibility of the heart to cocaine should throw light on the conditions in other tissues susceptible to the action of cocaine. In view of the fact that cocaine is a general protoplasmic poison, I conclude therefore, that those tissues primarily stimulated and depressed in the body by cocaine must normally adsorb less calcium from the blood than do the tissues later stimulated and depressed.

There is no abrupt change from stimulation to depression, but the perfusing solution remaining constant the latter gradually predominates over the former as the strenght of cocaine to which the heart is exposed is increased. Various grades of this change

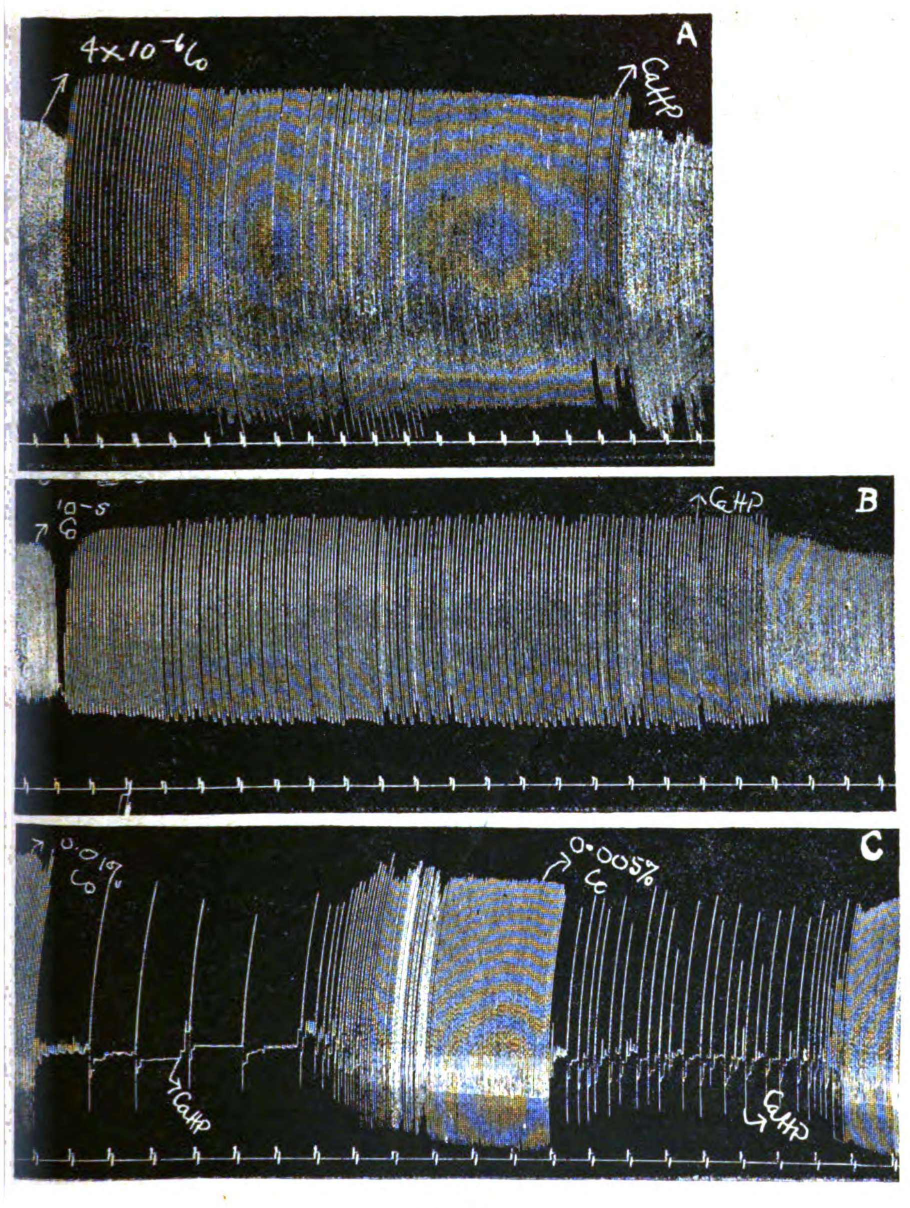


Fig. 2.

Fig. 2 A, B and C — All perfusing solutions were saturated with the dibasic phosphate of calcium = CaHP.

↑ 4×10^{-6} Co = perfusion of similar solution with the addition of four parts of cocaine in one million.

↑ 10^{-5} Co = addition of one part of cocaine in one hundred thousand

0.01 % Co and 0.005 % Co gives percentages of cocaine.

are shown in the accompanying tracings (See figg. 2 and 3).

I have not observed the increase of ventricular rate noted by Mosso (15) during the time cocaine was a constituent of the perfusing fluid, but I have almost regularly observed acceleration when the heart was recovering from a depressing dose as may be seen above in fig. 3.

The slowing of the rate of ventricular beat with increase of the height of the individual contractions shown in the above figure seem

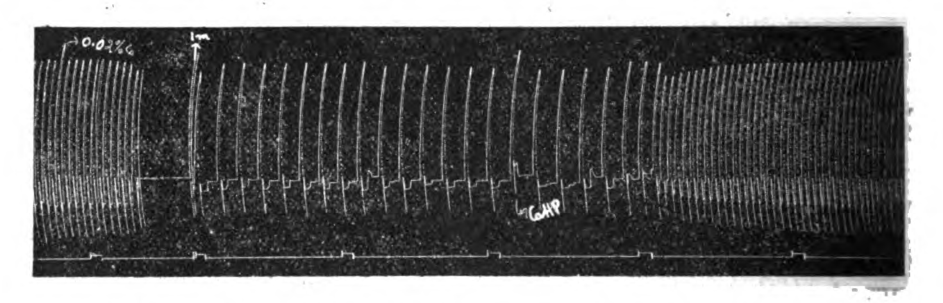


Fig. 3. — Notation as in Fig. 2. — 1 m. = interval of one minute.

to be the actual phenomena absenved by Weiler (17). I found, however, that this slowing was associated with an A.-V. delay and heart block of which various grades are shown above.

In the final stage of the action of cocaine on the heart found by me it stopped in the dilated electrically inexcitable condition. For similar reasons to those found with augmentation, the stoppage cannot be associated with any particular concentration of drug. A brief augmentation was frequently observed before the onset of failure. Confirming Mosso (15) and Crile (11) I found atropine without influence on this depression. On replacing the cocaine solution by Ringer the heart very slowly recovered and began to beat again.

The cycle of events, stoppage by cocaine and recovery on Ringer, could be repeated apparently indefinitely without damage to the heart's capacity for activity so that the recovery from the drug was complete.

During the recovery, however, there was a temporary rebound to increased activity. The contractions gradually increased in size and eventually reached a height greater than those existing before the heart was exposed to cocaine. They remained at this greater height a variable time and then suddenly decreased slightly in height but markedly increased in rate, the heart at this stage beating slightly stronger and much faster than it had previous to the treatment with cocaine (See fig. 4).

These marked stimulatory effects had their cause in the previous treatment with cocaine so that from them we must conclude that

the drug in spite of the fact that it stopped the heart in diastole had also exerted some stimulating action.

The explanation of this is rendered easier by digressing to consider the simpler case of sodium chloride. This salt exerts two

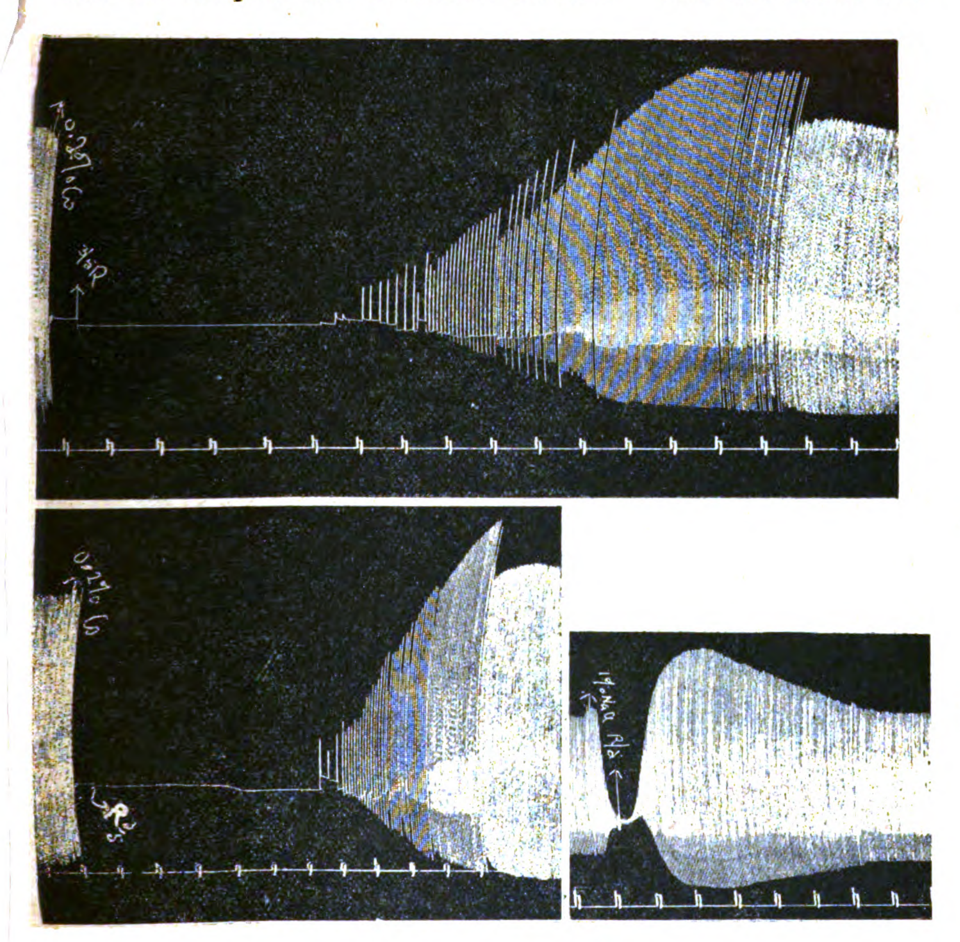


Fig. 4 *A and B.* — Notation as in other figures.
Calcium content of perfusing solutions = 0.015 % $CaCl_2$ = 3/5 R.
Fig. 4 *C* — Calcium content of perfusing solution 0.005 % $CaCl_2$.
At H sodium chloride content increased from 0.6 % to 1 %.
At N sodium chloride content restored from 1 % to 0.6 %.

actions on cardiac excitability as may be gathered from the accompanying tracings (See fig. 5).

On perfusing through the heart a Ringer's solution containing added sodium chloride the beats undergo a quickly produced depression succeeded by a more slowly produced augmentation which proceeds to its maximum and then the beats remain constant. Next

on restoring the sodium content to its original value there follows a quickly produced augmentation succeeded by a slowly effected depression ending in restoration of the heart to the status quo ante. Examining the tracings further, however, we note that the quickly produced depression seen after the sodium chloride was increased was

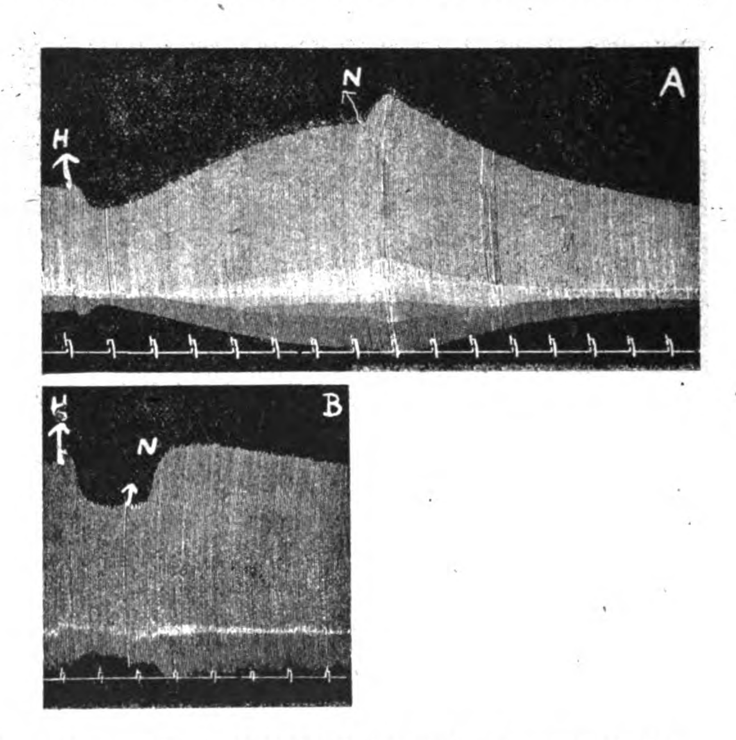


Fig. 5 *A.* — Calcium content of perfusing solution was 0.01 % $CaCl_2$.
At H sodium chloride content increased from 0.6 % to 1 %.
At N sodium chloride content restores from 1 % to 0.6 %.
Fig. 5 *B.* — Calcium content of perfusing solution was 0.015 % $CaCl_2$.
At H sodium chloride content increased from 0.6 % to 1 %.
At R sodium chloride content restored from 1 % to 0.6 %.

equal in degree and duration to the quickly produced augmentation seen after the sodium chloride was made normal again and that the slowly produced augmentation was equal to the slowly effected depression. From the equalities of the two quick changes, the equalities of the two slow changes and the absence of equality between quick and slow, I conclude that the quick augmentation seen after the sodium chloride was made normal was a reversal of the quick depression previously seen after the sodium chloride was increased and that the slowly effected depression was a reversal of the previous slowly effected augmentation. There are, thus, two modes of cardiac excitability change, each of which can go its own way independently

of the other, so that they must be mediated by different cardiac mechanisms.

Turning again to the first tracing of Fig. 5. above, we note that the heart beat stronger on the hypertonic solution than it had previously on the normal, but that in spite of this the previous quickly produced depression remained so that an augmentation does not imply augmentation only but only a *predominance* of augmentation over depression. The converse of this is true also in that depression does not imply depression only, but a predominance of depression over augmentation. This point is illustrated by the last tracing of fig. 4. above, where the conditions of the experiment were varied so as to permit of the sodium chloride stopping the heart in diastole. We note that on making the sodium chloride normal again the heart recovered from the depression as quickly as it had failed and that it entered into a period of temporarily augmented activity from which there was a slow restoration by subsidence to the status quo ante. We note also that the underlying cardiac change responsible for the augmentation developed more quickly under the conditions of fig. 4 C. than of fig. 5. The differing calcium contents of the perfusing solutions are responsible for these differences. Subsidence of the augmentation is always slow, however, and from this tendency to lag behind removal of its producer (hysteresis) I have suggested it to be mediated by a changed state of aggregation of the colloids of the excitable tissue (7).

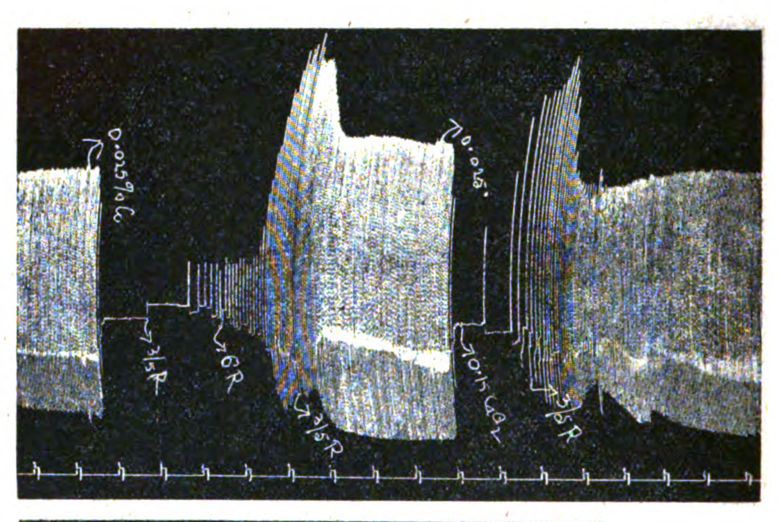
When then we find that the heart stopped in diastole by cocaine not only recovers therefrom but also exhibits a temporary condition of augmented activity before restoration to the status quo ante we can conclude that the depression was not pure but a predominance of a depressive change over an augmentive and that the two changes can proceed independently of one another. The depressive change was reversed before the augmentive with the result that functional capacity returned at a time when the cardiac mechanism was still « set » for augmentation.

The rate of return of functional capacity in hearts depressed by cocaine was greatly increased by increasing the calcium content of the perfusing solution.

Any feebly beating heart beats stronger when the calcium content of the perfusing solution is increased, but if that be done to a heart beating feebly as a result of the continued perfusion of Ringer's solution alone the beneficial effect following that increase of calcium passes away immediately after the calcium is restored again to its normal whereas the beneficial effect of a temporary increase of calcium in hearts recovering from cocaine remained.

The cocaine depression we may take to depend on the formation of some cocaine-heart-muscle combination of less functional

capacity than normal and the slow recovery on Ringer after the depression indicates a slow breakdown of this compound. The facts that calcium hinders the formation of this compound and so markedly hastens its reversal indicate that the paralysing action of



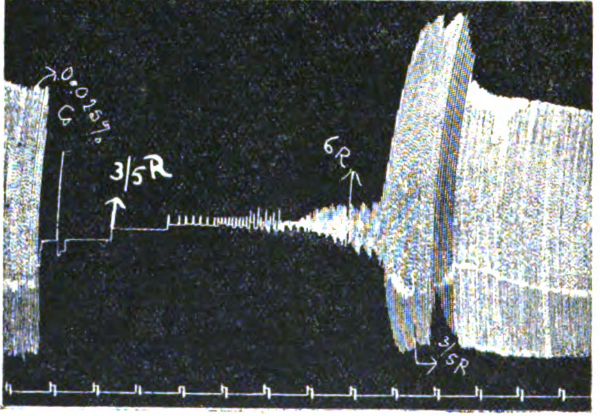


Fig. 6. — Notation as in other figures.

↑ 6R commencement of perfusion of a solution with a calcium content of 0.15 % $CaCl_2$.

cocaine must be associated with some form of deprivation of the affected tissues of their calcium. In this connection it is of interest that the general anaesthetics (8) also appear to reduce the capacity of tissues to enter into their normal combinations with calcium.

As with the general anaesthetics (8) also the heart dilated and rendered electrically inexcitable by cocaine contracts fully on exposure to a 5 % solution of potassium chloride (See fig. 7).

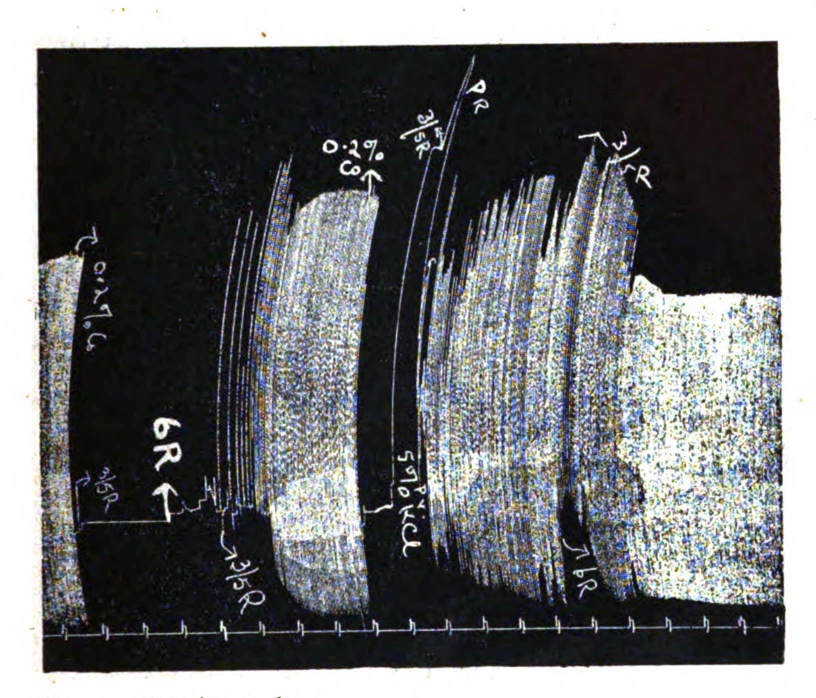


Fig. 7. — Notation as above.

5 % KCl = perfusion of 5 % KCl solution begun.

P. R. = perfusion pressure raised.

P. V. = movements of lever due to pumping out KCl solution, not to cardiac contractions.

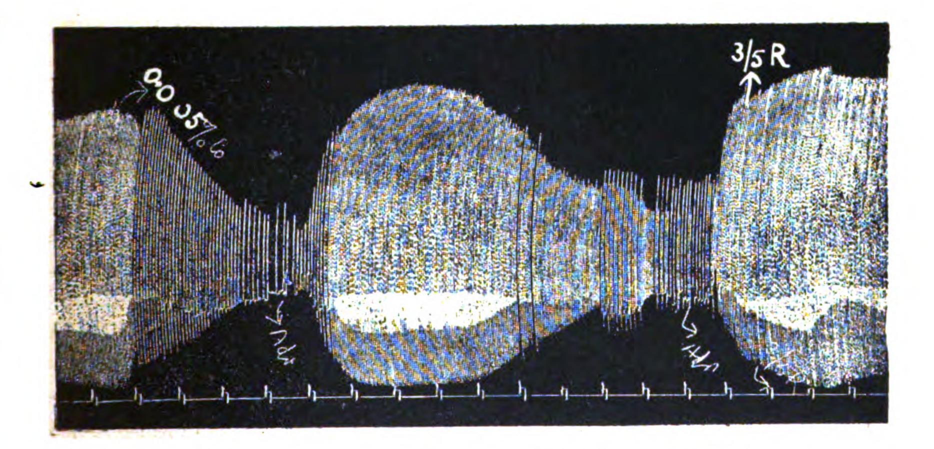


Fig. 8. — Calcium content of perfusing solution 0.015 % $CaCl_2$.

At ↑ Adr one drop of adrenalin placed in cannula and perfusion of cocaine solution continued.

This experiment shows that the contractile material retained its function of contraction and also according to previous work (6) that a certain group of calcium salts assisting to form semi-permeable membranes surrounding that contractile material remained intact. The seat of action of cocaine must then be external to these intact structures. It is of interest, therefore, that another group of calcium salts does exist external to these and that it subserves the functions of irritability to induced shocks, conduction, etc., which were the functions interfered with by cocaine. Further potassium salts profoundly influence this structure directly, and we note from the experiment above that they assisted to reverse the action of cocaine. The anatomical nature of the affected structure may be left open for we have choice of sarcoplasm (3-8), Plasmahaut (12), or receptive substance (13).

The depressing action of cocaine on the heart is antagonised by adrenalin which may account for the modern relative infrequency of cocaine accidents since the two began to be employed together for the adrenalin would be expected to accompany any cocaine that escaped into the general circulation and so protect the heart against its depression (See fig. 8).

THEORETICAL.

Excitability according to Hober (12), Macdonald (14) and others is mediated by changes of colloidal aggregation. Cocaine appears to produce such changes for the mode of development and especially the slow sudsidence of the augmentation are similar to those observed with sodium chloride and found explicable as mediated by collodial aggregation change. In view of the antagonism of this cocaine change by calcium the coagulator it would appear to be one of a finer state of colloidal subdivision than normal.

Vital activity, however, depends on interactions taking place between colloids and their associated electrolytes so that any increased functional capacity conferred on a tissue by alterations in colloidal aggregation will become ineffectual if there be a contemporary interference with the capacity of those same colloids to interact with electrolytes just as opening wider the throttle of a petrol motor would be ineffectual if it were accompanied by a short-circuiting of the spark.

From the experiments above the depressive action of cocaine emerged as hingeing on an interference with the capacity of the affected tissue to react with electrolytes, calcium especially being involved. In presence of such an interference changes of aggregation are of no avail to produce increased activity, so that the underlying change suggested to mediate the augmentation produced by

small amounts of cocaine could still be produced even to a much higher degree by the larger amounts of cocaine and be ineffectual because of the interference with capacity to react with electrolytes. We see this augmentation, however, as a rebound after cocaine because the mechanisms mediating depression and augmentation are different and are reversed at different rates.

The effects produced by the drug on a given tissue depend on the balance between the two actions. At the one extreme depression is negligeable or even absent and we have a predominance or isolation of augmentation. On increasing the dose depression shows itself and the effects are varying mixtures of depression and stimulation ending with further increase in a predominance of depression.

From the experiments above also depression and stimulation depend on different mechanisms. Depression is not a necessary sequel to the augmentation but due to a different cause which is brought into play by increasing the dose. In respect of its tonic action, therefore, cocaine is a drug that cannot be pushed for while by increase of dose we can intensify the underlying cardiac change mediating stimulation we may more than counterbalance its effects by bringing into play the depressive action.

SUMMARY AND CONCLUSIONS.

1. Small doses of cocaine exert a stimulating action on the heart unaccompanied by evidence of depression or with depression as a necessary sequel.
2. The depressing action of large doses of cocaine is a predominance of depression over stimulation,
3. The experimental evidence shows that the two actions of cocaine are mediated by different mechanisms.
4. It is suggested that stimulation is mediated by altering the state of aggregation of the colloids of the affected tissue and that depression is mediated through an interference with the capacity of the same colloids to interact with electrolytes especially calcium.
5. The actions of cocaine are so influenced by calcium that it is not possible to associate the production of definite cardiac effects with a particular concentration of drug.
6. The susceptibility of the heart both to the depressing and stimulating action of cocaine is greatly increased by decreasing the calcium content of the perfusing solution.
7. Since cocaine is also a general protoplasmic poison it is suggested on the basis of these experiments that those tissues of the body primarily stimulated and depressed by cocaine must have an inherently less capacity to adsorb calcium from the blood than those tissues later stimulated and depressed.

REFERENCES.

1. v. ANREP. — *Pflüger's Archiv.*, 21, p. 38, 1880.
2. BOSE. — *Brit. Med. Journ.*, 16, p. 1, 1913.
3. BOTAZZI. — *Journal of Physiol.* 21, p. 1, 1897.
4. BURRIDGE. — *Ibid.*, 54, p. 248, 1920.
5. BURRIDGE. — *Ibid.*, 53, *Proc. Physiol. Soc.*, p. LIX, 1919-20.
6. BURRIDGE. — *Quart. Journ. of Exp. Physiol.*, 5, p. 347, 1912.
7. BURRIDGE. — *Ibid.*, 12, p. 355, 1920.
8. BURRIDGE. — *Quart. Journ. of Medicine*, 10, p. 141, 1917.
9. BURRIDGE. — *Ibid.*, p. 163.
10. BURRIDGE. — *This Journal*, 25, p. 481, 1921.
11. CRILE. — *Journ. of Amer. Med. Ass.*, 1, p. 491, 1902.
12. HOBER. — *Physikalische Chemie d. Zellen*, Leipzig, 1911.
13. LANGLEY. — *Proc. Roy. Soc.*, 78 B, p. 170, 1906.
14. MACDONALD. — *Quart. Journ. of Exp. Physiol.*, 2, p. 5, 1909.
15. MOSSO. — *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 23, p. 153, 1887.
16. RIVERS. — *Fatigue*, London, 1908.
17. WEILER. — *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 80, p. 131, 1916-17.

LABORATOIRE DE BIOLOGIE GÉNÉRALE DU COLLÈGE DE FRANCE
DIRECTEUR : PROFESSEUR E. GLEY.

Action hyperthermisante du bleu de méthylène

PAR

C. HEYMANS & ET. MAIGRE

L'hyperthermie expérimentale peut être obtenue soit par des lésions du système nerveux central, soit encore par l'injection de substances toxiques à composition chimique non déterminée. WOOD (1) a provoqué la fièvre en injectant de la pepsine et ROUSSY (2) par l'injection d'un produit extrait de la levûre de bière. On sait que l'injection de suspensions colloïdales permettent d'obtenir des poussées hyperthermiques.

Les corps thermogènes à composition déterminée sont peu nombreux, on connait la β- tétrahydronaphtylamine, la strychnine, la caféïne; la cocaïne, l'atropine et l'adrénaline.

Sauf pour la tétrahydronaphtylamine et la strychnine, l'hyperthermie qu'ils provoquent, ne dépasse guère un degré et pour ce qui concerne ces dernières substances leur action hyperthermisante est due surtout aux convulsions et aux contractures que leur injection provoque.

Une série d'expériences, que nous avons déjà résumées dans une note à la Société de Biologie (3), nous permet de montrer que le bleu de méthylène en injection intraveineuse chez le chien, tout en ne présentant qu'une toxicité très faible et ne provoquant ni contractures, ni convulsions, produit néanmoins une hyperthermie très notable.

Voici le détail de quelques expériences :

---

(1) WOOD : cit. par POUCHET : *Leçons de Pharmacod.*, vol. IV, p. 71. Paris 1904.

(2) ROUSSY : *Arch. de Physiologie*, T. XXV, p. 355. 1890.

(3) C. HEYMANS et ET. MAIGRE : Le Bleu de méthylène, corps hyperthermisant. C. R. Soc. Biol., 1921, LXXX, 141.

I. Action du bleu de méthylène (1) sur le chien non anesthesié.

Chien n° 9 ♂, bâtard, jeune, fixé en position dorsale, canule dans la veine saphène droite. Poids : 7 kgr.

Heures	Quantités injectées dans la veine saphène	Température rectale prise au thermomètre coudé	Respiration
4.25	5 centigr.	38.3	Normale
4.30	5 cgr.	38.5	—
4.35	5 cgr.	38.75	—
4.42	—	39.3	Polypnée.
4.43	5 cgr.	39.4	id.
4.52	5 cgr.	39.9	Forte polypnée.
4.55	—	40.	id.
5.	—	40.35	id.
5.15	—	40.7	id.
5.25	—	41.	id.
5.35	—	41.3	id.
5.50	—	41.7	id.
6.	—	41.9	id.
6.05	—	42.1	id.
6.10	—	42.3	id.
6.15	—	42.4	id

Le chien devant servir à une autre expérience fut chloralosé.

Chien N° 4 ♀, fox, vieux, fixé en position ventrale, canule dans la veine saphène gauche. Poids : 7 kgr.

Heures	Quantités injectées dans la veine saphène	Température rectale prise au thermomètre coudé	Fréquence respiratoire
3.55	5 centigr.	39.2	—
4.02	—	39.4	90
4.10	5 cgr.	39.4	90
4.15	—	39.4	Polypnée.
4.20	5 cgr.	39.4	id.
4.27	id.	39.4	id.
4.45	id.	39.4	id.
5.	id.	39.2	id.
5.20	id.	39.2	id.
5.40	—	39.2	Respiration accélérée.

On détache l'animal. — Le chien a parfaitement survécu.

(1) Toutes les solutions de bleu de méthylène pur du laboratoire Bruneau étaient à 1 % dans l'eau salée à 9 ‰.

Ces deux expériences montrent que la température commence à s'élever quelques minutes après la première injection et que la polypnée de défense s'établit aussitôt. Elles font voir aussi de grandes différences dans les réactions individuelles, d'après l'effet de la polypnée.

Il est en effet des chiens qui, malgré des doses relativement considérables de bleu de méthylène, mais grâce à la polypnée, parviennent à ne pas dépasser sensiblement la température normale (chien n° 4). Pour pouvoir étudier plus aisément la marche de l'hyperthermie et, en outre, pour savoir s'il y a une température limite qu'elle ne peut dépasser ou, au contraire, si elle peut s'élever jusqu'à causer la mort, nous avons enlevé une partie de leurs moyens de défense antithermique à certains de nos chiens. Dans une série d'expériences, un lien était serré autour du museau, assez pour diminuer la respiration buccale, conséquemment l'évaporation buccale et pulmonaire, pas assez pour modifier notablement le rythme respiratoire :

II. Action du bleu de méthylène sur le chien non anesthésié dont le museau est maintenu par un lien.

Chien N° 7 ♂, bâtard, jeune, fixé à 1 h. 35 en position ventrale, canule dans la veine saphène gauche. — Poids : 7 kgr.

Heures	Quantités injectées dans veine saph.	Température rectale	Fréquence respiratoire par minute	Remarques
1.40	—	38°9	20	
1.50	5 cgr.	38°	20	
1.53	—	39°1	120	Polypnée intermittente.
2.05	5 cgr.	38°9	»	id.
2.08	—	39°	»	id.
2.10	—	39°	»	id.
2.17	5 cgr.	—	»	Lien autour du museau.
2.30	—	39°1	polypnée	Langue pendante.
2.36	5 cgr.	—	»	
2.43	—	39°2	»	
2.59	5 cgr.	38°9	»	
3.04	—	39°	»	
3.11	5 cgr.	39°	»	
3.16	—	39°2	»	
3.19	5 cgr.	—	»	
3.25	—	39°4	»	
3.28	5 cgr.	39°5	»	
3.40	—	39°7	»	Salivation
3.43	5 cgr.	—	»	
3.53	—	40°	»	
4.12	5 cgr.	40°3	»	
4.30	5 cgr.	40°4	»	

Heures	Quantités injectées	Température rectale	Fréquence respiratoire par minute	Remarques
4.40	5 cgr.	40°7	»	
5.12	—	41°5	»	
5.10	—	42°	»	
5.20	—	42°5	très forte polypnée.	Chien paraissant encore en bon état.
5.42	—	43°	»	Lien détaché.
5.50	—	43°3	»	Tremblement, raideurs.
5.57	—	43°2	»	Convulsions.
6.22	—	42°0	»	Mort.

Chien N° 5 ♂, *bâtard, jeune, fixé à* 1 h. 30 *en position ventrale, canule dans veine saphène gauche et lien autour du museau.* — *Poids* : 6 *kgr.*

Heures	Quantités injectées	Température rectale	Fréquence respiratoire	Remarques
1.35	—	39°2	—	
1.40	5 cgr.	—	—	
1.45	5 cgr.	39°2	accélérée.	
1.47	—	39°8	polypnée	Légère agitation.
1.55	—	40°	»	
1.57	5 cgr.	40°	»	
2.14	—	40°7	»	Salivation, animal calme.
2.17	5 cgr.	—	»	
2.22	—	41°	»	
2.32	—	41°5	»	Très forte polypnée.
2.48	—	42°1	»	
2.53	—	42°6	»	
3.06	—	43°	»	On enlève le lien du museau.
3.30	—	41°9	»	
3.56	—	41°5	»	Membres antérieurs raidis.
4.35	—	41°2	ralentie	
4.50	—	40°7	normale	
5.00	—	—	—	Secousses massétériennes.
5.10	—	41°2	—	
5.12	—	41°3	lente	Secousses convulsives.
5.13	—	—	arrêtée.	Le cœur bat.
5.17	—	—	—	Respiration artificielle : le cœur continue à battre quelque temps.

Donc, lorsqu'on réduit les moyens de défense d'un chien, le bleu de méthylène peut produire chez lui une hyperthermie très considérable et mortelle.

On sait que l'anesthésie diminue notablement la thermogénèse; l'animal anesthésié se refroidit. Voyons ce que produit l'injection du bleu de méthylène chez le chien anesthesié.

III Action du bleu de methylène chez le chien anesthésié.

Chien N° 6 ♀, fox, jeune, fixé en position dorsale et recevant une injection intraveineuse de chloralose dans l'eau salée à 9 ‰. — Poids : 7 kgr.

Heures	Quantités injectées	Température rectale	Fréquence respiratoire	Remarques
3.50	—	38°8	18	Anesthésie complète
3.53	5 centigr.	—	18	
4.05	5 cgr.	38°8	—	
4.15	5 cgr.	38°8	—	
4.30	5 cgr.	38°7	—	
4.40	5 cgr.	38°8	—	
4.50	—	39°	—	
4.55	5 cgr.		—	
5.12	5 cgr.	39°3	30	
5.50	—	39°8	—	
5.53	5 cgr.	—	—	
6.02	—	40°	36	
6.40	—	40°5	40	Respiration profonde
7.12	—	41°	43	
7.30	—	41°2	60	
7.45	—	41°3	polypnée.	
7.55	—	41°2	»	
7.57	3 cgr.	—	»	
8.10	—	41°	»	
8.25	—	41°2	accélérée	
8.55	—	40°	»	L'animal s'est remis, et a survécu.

Malgré les conditions défavorables, le bleu de méthylène a néanmoins produit une hyperthermie très marquée, plus régulière même que chez le chien normal ; l'anesthésie en effet, en supprimant la polypnée réflèxe, enlève à l'animal une de ses réactions antihyperthermiques. La polypnée qui s'est déclenchée lorsque la température rectale a atteint environ 41°3 est d'origine centrale, car elle s'est présentée régulièrement chez les différents chiens anesthésiés et hyperthermisés à la température rectale voisine de 41°6, qui est en effet la température qui, d'après RICHET, détermine chez le chien la polypnée centrale.

On sait que le chien anesthésié présente une hypothermie progressive pouvant atteindre plusieurs degrés. Nous avons injecté du

bleu de méthylène à des chiens se trouvant dans ces conditions d'anesthésie et d'hypothermie. Voici le résumé d'une de ces expériences.

Chien N° 3 ♂, bâtard, jeune, canule dans la veine saphène. — Poids: 10 kgr. — A 2 h. 10' injection intraveineuse de 1.10 gr. de chloralose dissous dans l'eau salée à 9 ‰.

Heures	Inj. de bleu de méthylène	Température rectale	Fréquence respiratoire	Remarques
5.05	—	36°1	4	
5.15	2.5 cgr.	—		
5.17	5 cgr.	—		
5.22	—	36°3		
5.30	—	36°6		
5.38	5 cgr.	36°8		
5.45	—	37°1		
5.50	—	37°3		
6.00	—	37°7	24	Anesthésie profonde.
6.05	5 cgr.	—		
6.10	—	38°4		
6.19	—	39°		
6.24	7 cgr.	39°2	20	
6.40	—	39°8		
6.50	—	40°		
6.53	5 cgr	—		
6.55	—	40°1	25	
7.05	—	40°3		
7.10	5 cgr.	—		
7.25	—	40°6		
7.45	5 cgr.	—		
7.50	—	40°8	accélérée	
8.10	8 cgr.	40°7		
8.20.	—	40°8	polypnée	Polypnée intermittente.
9.00	—	40°6	»	
9.35	—	40°3	»	Mise à mort.

Cette expérience montre que le bleu de méthylène permet de ramener assez vite à la température normale un chien en hypothermie et même de lui faire dépasser de beaucoup cette température.

Les recherches de EHRLICH, SEMI MEYER, CESARIS DEMEL, etc.. montrent que le bleu de méthylène, ou plutôt son leuco-dérivé se fixe électivement sur les éléments nerveux, c'est par les modifications fonctionnelles nerveuses qui en résultent qu'il faut, croyons-nous, chercher à concevoir le déterminisme de l'effet thermique du bleu de méthylène.

HANS MEYER (1) a fait à ce propos la constatation importante

(1) Deutscher Kongress für innere Medizin. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 1913, p. 808.

que tous les principes thermogénétiques connus, de composition chimique bien définie et dont les solutions ne présentent pas de caractères colloïdaux, sont, aux doses qui provoquent l'hyperthermie, ou des excitants du système sympathique, ou des paralysants des appareils nerveux antagonistes. Il est probable que le bleu de méthylène rentre dans cette dernière catégorie de corps. — Chez la grenouille en effet, après l'injection intraveineuse d'une solution convenable de bleu, l'excitation du vague n'est plus capable d'arrêter le cœur. Et la pilocarpine, qui agit sur le dernier relais ganglionnaire du pneumogastrique (1), n'exerce aucune influence antagoniste; de plus les ligatures de Stannius donnent encore leur effet normal, ce qui permet de conclure à l'intégrité fonctionnelle du muscle et de ses ganglions moteurs; enfin l'imprégnation directe du tronc nerveux par une solution même forte n'empêche pas son excitation d'arrêter les battements cardiaques (2). Ce sont donc bien les fibrilles terminales du vague que le bleu de méthylène, injecté dans un vaisseau, paralyse en même temps qu'il les imprègne ; on sait que ce sont elles aussi qui, elles seules, dans l'appareil de jonction neuromusculaire après cette injection, se colorent au contact de l'air (3).

RÉSUMÉ.

Le bleu de méthylène, en injections intraveineuses, détermine chez le chien une hyperthermie rapide et forte, pouvant atteindre 43° : hyperthermie déjà nette chez l'animal normal; hyperthermie très manifeste chez celui qui a été anesthésié par le chloralose, pouvant enfin être à coup sûr mortelle chez celui dont l'évaporation buccale est réduite.

L'interprétation de ce phénomène doit être cherchée dans les troubles fonctionnels que le bleu provoque en se fixant électivement sur certaines parties du système nerveux.

Le bleu de méthylène est la seule substance à composition chimique déterminée présentant une action thermogène aussi considérable; de plus sa toxicité est très faible, en effet la dose de 10 cgr. par kgr. donnée par fractions de 5 cgr. par animal n'est pas forcément mortelle. Si l'hyperthermie n'atteint pas 42° et n'est pas trop prolongée, l'animal peut survivre.

---

(1) GOTTLIEB et MEYER. — *Die experimentelle Pharmakologie als Grundlage der Arzneibehandlung*, 3e édition, 1914, p. 234.

(2) C. HEYMANS et ET. MAIGRE: *Action du bleu de méthylène sur l'appareil cardio-inhébiteur de la grenouille*. — C. R. de la Société Biologie, 11 juin 1921, p. 45.

(3) P. EHRLICH — *Biologisches Centralblatt*, 1886-87, p. 214. C. ARNSTEIN, *Anatomischer Anzeiger*, 1887, p. 125.

ISTITUTO DI FARMACOLOGIA E TERAPIA DELLA R. UNIVERSITA' DI NAPOLI.

E' L'ADRENALINA UN ORMONE?

PROF. PIO MARFORI

Chi negli ultimi anni abbia avuta l'opportunità di seguire la bibliografia intorno alle capsule surrenali, non si meraviglierà che io ponga una simile domanda a titolo di questa nota. Che l'adrenalina fosse un ormone a costituzione chimica ed a funzioni biologiche esattamente determinate, com'è a tutti noto, era da tempo un fatto ritenuto unanimamente acquisito alla scienza delle secrezioni interne.

Ma da qualche anno, dapprima alquanto timidamente, poi con assolute affermazioni è stato negato, sopratutto per opera del GLEY (1), all'adrenalina non solo il carattere di ormone, ma anche ogni altra funzione normale nell'organismo rilegandola fra i prodotti catabolici di rifiuto.

Non soltanto l'autorità del fisiologo di Parigi, ma gli argomenti e le ricerche sperimentali che egli ha prodotto in sostegno della sua tesi, sono di tale valore che meritano un accurato esame critico e sperimentale, poichè evidentemente la tesi del GLEY sconvolge completamente tutte le nostre conoscenze intorno alla funzione delle glandule surrenali e, se fosse dimostrata vera, farebbe crollare di un colpo le teorie finora accolte, non solo nel campo della fisiologia, ma anche in quello della patologia e della clinica.

Dirò innanzi tutto che il concetto fisiologico del GLEY intorno alla parola « ormone » mi sembra ben determinato e completamente accettabile. Perchè infatti un prodotto chimico passa essere considerato « ormone » è necessario che esso sia secreto da speciali tessuti, riversato nel sistema venoso o linfatico e per la via sanguigna, cioè, mediante il sistema arterioso, esso giunga agli elementi dei tessuti più o meno lontani sui quali è destinato ad esplicare le sue azioni elettive.

---

(1) E. GLEY et A. QUINQUAUD. *La fonction des surrénales*. Journal de Physiol. et de Path. génér. T. XVIII, p. 807, 1917-18.

E. GLEY, *Quatre leçons sur les Sécrétions internes*. Paris, Baillière et Fils, 1920.

Bisogna essere anche d'accordo con il GLEY quando egli asserisce che per la dimostrazione della natura ormonica di un prodotto sospettato tale, non basta la prova istologica relativa al tessuto produttore e neppure la prova chimica la quale del resto può essere, per ragioni tecniche, assai difficile ed anche impossibile a darsi. Ciò che ha importanza essenziale è, secondo il GLEY, la prova fisiologica la quale quando è completa è per se stessa bastante a caratterizzare un ormone. Ed è appunto essenzialmente in base a questo concetto della prova fisiologica che il GLEY è indotto a negare all'adrenalina il carattere di ormone.

Il GLEY nei vari suoi lavori sulle capsule surrenali e specialmente nelle sue «Quatre leçons sur les Sécrétions internes» (1) prende in considerazione e largamente discute gli argomenti che, a suo giudizio, depongono contro il concetto della funzione ormonica dell'adrenalina. Egli insiste sopratutto sui risultati delle proprie ricerche e di altri autori (LEWANDONSKI, 1899 ; CAMUS et LANGLOIS, 1900 ; Sc. VINCENT ed allievi, 1909-16) i quali in seguito alla doppia surrenalectomia o ad esperimenti analoghi, non hanno ossevato abbassamento della pressione arteriosa. Ma d'altra parte il GLEY non tien conto dei risultati perfettamente opposti ottenuti precedentemente da H. STREHL e O. WEISS (2). Questi autori con numerose ricerche e, per quanto si può giudicare dall'esame del lavoro, assai complete, hanno dimostrato che nei conigli, in cui non esistono capsule surrenali accessorie, la doppia surrenalectomia produce subito abbassamento della pressione (20-30 mm. Hg.) che va mano mano facendosi più forte fino alla morte. Inoltre gli stessi autori poterono dimostrare che dopo la estirpazione di una surrenale, la compressione e la chiusura del lume della vena surrenale dell'altra capsula, dà luogo immediatamente ad ipotensione e che tolta la compressione sulla vena, la pressione torna a aumentare. Gli autori riportano anche grafiche assai chiare e dimostrative.

Il GLEY mette pure in rilievo le ricerche sperimentali proprie e di altri, le quali starebbero contro il concetto, generalmente accettato, che l'adrenalina sia un eccitante fisiologico del simpatico. Non intendo qui discutere tale questione, ma debbo pur rilevare che su questo argomento esistono ricerche sperimentali contradittorie e che le esperienze del GLEY intorno all'influenza dell'adrenalina sul simpatico e specialmente nei riguardi della glicosuria da puntura del 4° ventricolo, sono in opposizione a precedenti ricerche ed anche a quelle recenti del giapponese IJURE FUJII (3), al cui importante lavoro rimando il lettore.

(1) E. GLEY, l. c.

(2) H. STREHL u. O. WEISS. *Beitrage zur Physiol. der Nebennieren*. Pflüger's Arch. Bd. 86, S. 107, 1901.

(3) IJURO FUJII. *Ueber die Veränderungen des Gehaltes der Nebennieren an chromaffiner Substanz bei einigen experimentellen Diabekes-formen zentralen Ursprungs*. The Tokyo Journal of experimental Medecin. Vol. I, n° I, p. 38, 1920.

Per quanto interessanti per la funzione biologica dell'adrenalina sieno le ricerche alle quali ho testè accennato e sulle quali sarebbe senza dubbio desiderabile un più completo accordo di opinioni, a me preme ora richiamare soltanto l'attenzione sul fatto che il GLEY per risolvere il quesito se l'adrenalina sia un ormone, dà *valore essenziale* alla prova fisiologica relativa alla vasocostrizione ed alla ipertensione che l'adrenalina è capace di determinare. E' necessario a questo punto mettere bene in chiaro il concetto del GLEY.

E' ormai fuori di dubbio che il sangue delle vene surrenali contiene adrenalina e che questa aumenta in diverse condizioni, come l'eccitamento del nervo splancnico. Ma secondo il GLEY la presenza dell'adrenalina nel sangue venoso delle surrenali e l'aumento prodotto dall'eccitazione del simpatico, non implicano la conseguenza necessaria che l'adrenalina eserciti *un ufficio fisiologico* nell'organismo. I fatti suddetti non rappresentano per il GLEY che una prima condizione, per quanto indispensabile, perchè il prodotto possa ritenersi un ormone. Affinche' la sostanza dimostrata nel sangue venoso di un organo possa agire su organi più o meno distanti da quello dove si forma, occorre evidentemente che penetri nella circolazione generale. Nulla prova *a priori*, osserva sempre il GLEY, che il prodotto trovato nel sangue efferente di una glandula nel momento in cui viene provocata la sua attività, passi nel sangue arterioso. Esso può infatti diluirsi siffattamente nella massa sanguigna da non conservare più alcuna azione, può distruggersi passando attraverso i polmoni ossidandosi e perdere ogni proprietà biologica. Perciò il GLEY crede necessario che questo prodotto per essere ritenuto ormone sia seguito fino nel sangue arterioso e in questo ne sia dimostrata la presenza. Bisogna dunque, continua il GLEY, per caratterizzare una secrezione interna poter ritrovare nel sangue del cuore sinistro e nel sangue arterioso dei grossi vasi il principio attivo e che questo manifesti le sue proprietà specifiche. Tale è la condizione fisiologica necessaria per giudicare se un dato prodotto secreto da un tessuto e riversato nel sangue venoso, è un ormone.

Poichè è noto che piccolissime dosi di adrenalina iniettate nel sangue di un animale producono un forte aumento, per quanto passeggero, della pressione arteriosa dovuto ad intensa vasocostrizione, così il GLEY ritiene che si debba dare la dimostrazione della presenza dell'adrenalina nel sangue arterioso avvelendosi di questa azione elettiva ipertensiva dell'adrenalina.

Il metodo sperimentale del quale il GLEY E QUINQUAND (1) si servono, consiste nel prendere una certa quantità di sangue arterioso (20-40 c. c.) durante la stimolazione del nervo splancnico e nell'iniettarlo nelle vene di un altro cane (reattivo) od anche nello stessó cane

(1) GLEY et QUINQUAUD, l. c.

in successivo periodó sperimentale. Secondo il GLEY in queste condizioni se l'adrenalina si trova nel sangue arterioso iniettato nell'animale reattivo, deve dimostrare la sua azione ipertensiva in questo animale e la mancanza di questa azione sta *sicuramente* a dimostrare che essa non ha l'ufficio fisiologico che le viene attribuito. L'A. dà tale grande valore a questo esperimento da chiamarlo addirittura *l'esperimentum crucis* per la risoluzione del problema. E poichè il GLEY non trova in queste sue esperienze il ricercato aumento della pressione arteriosa o tutt'al più un aumento trascurabile, cosi conclude, come già dissi, che l'adrenalina non ha alcun afficio biologico, non è un ormone.

Senonchè prima di accettare una così grave conclusione è il caso di chiedersi se dall'esperimento eseguito dal GLEY può veramente trarsi con sicurezza la conclusione che egli crede necessaria ed assoluta.

Ben considerando le richerche di GLEY, a me sembra che nella mente di chi ha in pratica lo studio delle azioni biologiche degli agenti chimici nell'organismo, debba sorgere il dubbio che quella esperienza così come è concepita ed attuata, possa realmente dare la certezza che l'autore le attribuisce. E' ben noto che ogni sostanza ad azione biologica elettiva perchè possa dimostrarsi attiva é necessario che giunga ai tessuti in una certa dose minima, poichè in dose anche di poco più piccola, resta senza effetto e può anche talora avere un effetto contrario.

E a tal proposito faccio rilevare che recentenrente A. CONCATO (1) ha dimostrato che l'adrenalina nei vasi isolati in soluzione diluitissima (1 : 30.000.000) produce manifesta *vasodilatazione*, mentre a dosi maggiori (1 : 16.000.000 e sopra) palesa sempre azione *vasocostrittiva* ed attiva potentemente i movimenti ritmici dei vasi.

Ora io penso che la piccola quantità di adrenalina esistente nel sangue arterioso dell'animale sottoposto alla eccitazione dello splancnico nell'esperimento del GLEY, possa ben essere sufficiente a produrre in tale animale gli effetti biologici sulla circolazione senza che sia necessario ammettere che 20-30 c.c. di questo medesimo sangue, cioè, una piccola parte di esso, immesso in tutta la massa sanguigna di un altro animale o riiniettato, in un secondo tempo, nel torrente circolatorio dello stesso animale, debba essere ancora in grado di produrre gli effecti pressori cercati dal GLEY. Bisogna poi, anche riflettere che la funzione che normalmente esercita l'adrenalina non può certamente esere quella di *aumentare* la pressione arteriosa in un animale normale, ma è quella di mantenere normale il *tono vasale*, il che è cosa ben diversa. E si ritiene che allo stesso ufficio sieno destinati altri prodotti, oltre all'adrenalina.

Intanto mi preme di rilevare che dalle esperienze di GLEY e QUINQUAUD risulta che l'iniezione di alcuni cent. cubici di sangue

(1) A. CONCATO. *Archivio di Fisiologia*. Vol. XVIII, fasc. 1-2, pp. 83 (anno 1919).

raccolto dalle vene surrenali e dalla cava inferiore subito al disopra dell'imboccatura della surrenale durante l'eccitazione dello splanc nico, determina nell'animale reattivo un sensibile aumento della pressione arteriosa.

Ciò sta senza dubbio a dimostrare che 30-40 c. c. di sangue presi nelle succitate condizioni, contengono tale quantità di adrenalina da produrre effetti pressori nell'animale reattivo, ma non esclude che altrettanto sangue *arterioso*, nelle stesse condizioni sperimentali, possa contenerne ancora solo una così piccola quantità da non dare nel cane reattivo ben rilevabili effetti pressori, pure potendo tale minima dose circolante nel sangue dell'animale produttore, essere in questo biologicamente attiva. E ho detto ben rilevabili effetti pressori, poichè se si studiano le grafiche riportate dal GLEY e QUINQUAUD, si trova che un certo aumento, per quanto piccolo, della pressione arteriosa si osserva quasi costantemente, in seguito all'iniezione di sangue arterioso. Vero si è che gli autori fanno notare che tali lievi aumenti pressori non hanno importanza dimostrativa e possono ottenersi anche per semplice iniezione di soluzione fisiologica. Ed io sono in ciò d'accordo con gli autori, ma debbo pur notare a mia volta che, anche prescindendo dal fatto che in alcune esperienze l'aumento di pressione non è stato tanto piccolo da non meritare una certa considerazione, viene spontanea a questo proposito l'osservazione che se nel sangue arterioso fosse contenuta normalmente pressochè la stessa quantità di adrenalina che si trova nelle vene surrenali, si avrebbe costantemente una ipertensione tale da costituire un vero stato patologico, come probabilmente accade in qualche contigenza morbosa.

Ora a me sembra che se si potesse dimostrare che prendendo 20-40 c. c. di sangue arterioso da un animale mentre si inietta in esso l'adrenalina nelle vene e precisamente nel periodo in cui si manifesta una distinta azione pressoria, cioè, quando l'adrenalina trovasi nel sangue in tale quantità da dare una manifesta azione e che questo sangue iniettato nelle vene dell'animale reattivo non è capace di dar luogo ad azione ipertensiva, si potrebbe — a mio avviso — concludere che l'adrenalina può trovarsi nel sangue arterioso di un animale in dose sufficiente a produrre in esso la sua azione biologica elettiva, senza che tuttavia una certa quantità del sangue arterioso di detto animale possa, iniettato in altro animale, manifestare ancora notevoli effetti pressori per l'adrenalina sicuramente contenutavi.

Se questo esperimento conn tale risultato può realizzarsi, io credo che le esperienze del GLEY perderebbero il grande valore che egli loro attribuisce.

In una prima serie di esperienze ho iniettato nelle vene di cani la *quantità minima* di adrenalina capace di dare una ben manifesta ipertensione che veniva determinata mediante il manometro a mercurio applicato ad una grossa arteria.

Nel momento della massima ipertensione prendevo dalla carotide

30-40 c. c. di sangue e dopo scomparsi completamente gli effetti della adrenalina, reiniettavo questo sangue in una vena dello stesso animale, ovvero, iniettavo il sangue in un altro cane già all'uopo preparató, esservandone gli effetti sulla pressione.

Si noti che in alcune ricerche (vedi esp. 4°) si praticava, senza interruzione, la iniezione intravenosa di una soluzione diluitissima di adrenalina durante tutto il periodo sperimentale, in modo che prima, durante e dopo la presa di sangue arterioso dall'animale datore penetrava regolarmente adrenalina nel sangue. Così ho creduto di riprodurre più esattamente le condizioni sperimentali di Gley e Quinquaud, i quali come già si disse, prendevano sangue arterioso durante l'eccitazione dello splancnico e quindi durante, così si ritiene, il il continuó flusso di adrenalina nel sangue. Tale modalità sperimentale pone anche al riparo dalla possibile obbiezione che durante la presa di sangue arterioso, nonostante che questa coincida con l'ipertensione arteriosa prodotta, non si ritrovi più adrenalina nel sangue in quanto già sia stata fissata ed inattivata o distrutta dagli elementi dei tessuti dove essa agisce.

In una seconda serie di ricerche, iniettavo nei cani una dose alta di adrenalina e per il resto procedevo come ho detto precedentemente. Dirò subito che lo scopo di queste ultime esperienze era quelló di assicurarmi che l'adrenalina non viene distrutta tanto rapidamente nell'organismo del cane che, iniettata in dose sufficiente, non sia possibile dimostrarne la presenza nel sangue arterioso in tale quantità da dare la sua azione ipertensiva con l'iniezione di piccola quantità di sangue dell'animale datore nell'animale reattivo.

Esperimenti di questo genere non sono per altro senza precedenti, sebbene fatti con intenti diversi da quello che io mi sono proposto. Infatti De Vos e Kochmann (1) già molti anni or sono allo scopo di determinare la rapidità con cui l'adrenalina scompare dal sangue dopo iniezioni intravenose, hanno potuto dimostrare che il sangue estratto dalla carotide di un coniglio al quale siasi praticata una iniezione intravenosa di soprarenina (vena marginale dell'orecchio), se viene iniettato nella giugulare di un secondo coniglio, dimostra o no di contenere adrenalina mediante l'aumento pressorio nel coniglio reattivo, a seconda della dose di soprarenina precedentemente iniettata e del tempo in cui il sangue venne estratto dopo l'iniezione,

Ma queste ricerche non possono servire alla dimostrazione da me ricercata perchè anche le dosi più piccole di soprarenina usata dagli autori, furono sempre relativamente molto alte. Ricorderò tuttavia che De Vos e Kochmann trovarono che dopo iniezione della dose minima letale di soprarenina, (mgr. 0,7 per Kgr. di animale)

(1) J. De Vos et Kochmann. *De la rapidité avec la quelle le principe actif des capsules surrénales, donné en injection intraveineuse, disparait du sang.* Arch. de Pharmacodynamie et de Thérapie. Vol. XIV, p. 81, 1905.

questa non é più svelabile nel sangue con il metodo sopraindicato dopo 10 M' dalla iniezione e dopo iniezione di 2/3 ed 1/3 di essa dose, non è più svelabile rispettivamente dopo 5 e dopo 3 minuti, mentre il sangue raccolto dalla carotide prima che sia trascorso il tempo suddetto ed iniettato in dose di c.c. 0,1-2,0 nella giugulare del coniglio reattivo, dà luogo ad un aumento più o meno notevole della pressione arteriosa. Gli autori surricordati, poterono anche con opportune ricerche stabilire che nel coniglio la dose minima attiva di soprarenina è di circa mgr. 0,0004 (quattro decimillesimi di milligrammo) (peso dei conigli da 1500-1800 grammi).

Ed ora ecco le mie esperienze brevemente riassunte nei loro risultati :

ESPERIENZA I.

Cane Kgr. 12 Cloralosato, respirazione naturale — Manometro alla femorale.

Tempo		Pulsazioni in 10''	Pressione art : in mm. Hg	Osservazioni
h = 15,30	normale	38	140	
h = 15,31	Iniezione nella femorale di 2 goccie di adrenalina in c.c. 2 d'H_2O in 10'' (1/10 mgr.)	30	230	Si prendono 30 c.c. di sangue dalla carotide durante la massima ipertensione.
h = 15,35	normale (dopo l'iniezione)	38	140	
h = 15,37	Iniezione intravenosa di 20 cc.. di sangue arterioso precedentemente estratto.	40	142	durante l'iniezione.
h = 15,37		40	140	subito dopo l'iniezione.
h = 15,40	Iniezione di 2 c.c. di sangue come sopra con aggiunta di I gocia di adrenalina	35	220	

RISULTATO = Risulta da questa esperienza che la reiniezione di sangue preso dalla carotide nello stesso animale dopo che gli furono iniettate nelle vene due goccie di una soluzione all'uno per mille di adrenalina (1), non ha prodotto sensibili modificazioni pressorie.

(1) L'adrenalina usata in queste ricerche è la soluzione allo 1 °/oo di Parke-Davis.

ESPERIENZA IIª

Cane Kgr. 9 — Cloralosato — Respirazione naturale.

Tempo		Pulsazioni in 10"	Pressione art: in mm. Hg.	Osservazione
h = 15,16	normale	46	130	
h = 15,20	Iniezione nella giugulare di I goccia e ½ di adrenalina (1/15 mgr.)	36	174	Si prendono 30 c.c. di sangue dalla carotide.
h = 15,25	normale (dopo l'iniezione).	54	130	
h = 15,28	Iniezione di 30 c.c. di sangue nella giugulare in 30" durante l'iniezione.	58	130	
h = 15,26	(subito dopo)	70	132	

RISULTATO = Anche da questa esperienza si vede che la reiniezione di sangue arterioso dopo iniezione nelle vene di 1 goccia e ½ di adrenalina 1 ‰ non produce alcuna modificazione pressoria.

ESPERIENZA IIIe.

Cane Kgr. 7 — Cloralosato — respirazione naturale — Manometro alla femorale.

Tempo		Pulsazioni in 20''	pressione art. in mm. Hg.	Osservazioni
h=15,5	normale	19	110-120	
h=15,5	Iniezione continua nella vena femorale di una soluzione di adrenalina in liquido di Ringer (c.c. 15 goccie 1 ½ di soluzione 1 °/oo in 100''.	25	148-160	Durante l'iniezione si prendono dalla caratide 30 c.c. di sangue.
h=15,24	normale (dopo l'iniezione)	24	104-110	
h=15,25	Iniezione nella femorale di 30 c.c. di sangue art. precedentemente estratto	28	104-110	

RISULTATO — In questa esperienza in cui durante tutto il 1^{e} periodo sperimentale penetrava adrenalina nelle vene (in tutto goccie 1 e ½), il sangue arterioso reiniettato nelle vene dell'animale non ha prodotto, come nelle precedenti ricerche, alcun aumento della pressione arteriosa.

ESPERIENZA IV°

Cane datore Kgr. 5 Manometro alla femorale. Iniezione nelle giugulare.

Tempo		Puls : in 10''	Pressione art. in mm Hg.	Osservazioni.
h = 16,2	normale	20	122	
h = 16,3	Iniezione intravenosa di 5 goccie di adrenalina in 3 c.c. di H_2O (1/4 mgr.)	16	180	Si raccolgono dalla carotide 30 c.c. di sangue durante la massima azione ipertensiva.

Cane raettivo Kgr. 4 — Cloralosato — Respirazione naturale Manometro alla carotide. Iniezione nella giugulare.

h = 16,15	normale	53	150	
h = 16,16	Iniezione intravenosa di 25 c.c. di sangue art. del cane datore in 40'' Durante l'iniezione	50	164-170	
h = 16,20	normale dopo l'iniezione	52	150	
h = 16,20	Iniezione di 5 c.c.; di detto sangue con aggiunta di I goccia di adrenalina ..	26	216	

Risultato — In questa esperienza per la iniezione di 5 goccie di adrenalina nel cane datore, si è osservato un sensibile aumento della pressione arteriosa in seguito ad iniezione di sangue arterioso dell'animale datore nelle vene dell'animale reattivo.

ESPERIENZA V•

Cane datore di Kgr, 8 Manometro alla carotide.

Tempo		Puls. in .o''	Pressione art. in mm Hg.	Osservazioni
h=14,20	normale	18	120	
h=14,21	Iniezione nella femorale di I c.c. di adrenalina (I mgr.)	16	200	Si predono 30 c.c. di sangue dalla carotide.
h=14,21	(subito dopo l'iniezione)	18	180	
h=14,22	....	18	130	

Cane reattivo di Kgr. 5 leggermente morfinizzato. Manometro alla femorale.

h= 5,31	normale	18	120	
h=15,32	Iniezione di 30 cc. di sangue	16	170	
h=15,32	....	18	150	
h=15,37	....	18	120	

RISULTATO. — Questa esperienza dimostra che in seguito ad iniezione di una dose di adrenalina corrispondente a I c.c. della solita soluzione, cioè, di I milligrammo di adrenalina, il sangue arterioso dell'animale datore iniettato nelle vene dell'animale reattivo, è capace di determinare *notevole aumento* della pressione arteriosa di quest' ultimo.

ESPERIENZE VI°

Cane datore di Kgr. 6 Manometro alla femorale.

Tempo		Pulsazioni in 10"	Pressione art. in mm. Hg.	Osservazioni
h = 14,01	normale	38	180	
h = 14,02	Iniezione di I c.c. di adrenalina nella giugulare (1 mgr.)	—	280	Si prendono 30 c.c. di sangue dalla carotide.

Cane reattivo di Kgr. 4 Manometro alla carotide. Iniezione alla giugulare.

h = 14,35	normale	68(?)	176	
h = 14,36	Iniezione di 30 c.c. di sague nella safena.	50	200	

RISULTATO. — Lo stesso che nella esperienza precedente.

Dalle esperienze riferite risulta che in seguito ad iniezione di una piccola dose di adrenalina (circa 2 gocce della soluzione 1 $^0/_{00}$) nel cane datore (dose tuttavia sufficiente a dare un ben manifesto aumento della pressione) il sangue arterioso di questo animale, preso durante la introduzione di adrenalina nelle vene e nel periodo di ipertensione ed iniettato in quantità di circa 30 c.c. nelle vene del cane reattivo, non produce alcuna modificazione della pressione arteriosa in questo ultimo. Con dosi di adrenalina un po' maggiori (5 goccie) si è potuto osservare nel cane reattivo un lieve aumento della pressione. Con dosi alte di adrenalina iniettata nel cane datore (goccie 20 = mgr. uno) si è ottenutó nel cane reattivo costantemente un forte aumento della pressione arteriosa, il quale non può essere attribuito ad altro che all'adrenalina contenuta nel sangue arterioso iniettato.

E' pertanto da ritenere che nelle prime esperienze (iniezione di dose minima di adrenalina) la mancata ipertensione nel cane reattivo, è soltanto da attribuire alla piccola dose di adrenalina iniettata con il sangue arterioso nell'animale reattivo stesso. Dalle mie ricerche viene dunque dimostrato che occorre un minimun di adrenalina nel sangue arterioso dell'animale reattivo, al disotto del quale non si possono produrre effetti pressori pur contenendo il sangue arterioso dell'animale datore una quantità di adrenalina bastante a produrre in esso la caratteristica sua azione ipertensiva.

Io credo dunque che la mancanta ipertensione nelle ricerche di GLEY e QUINQUAUD non può essere dovuta, come gli autori asseris-

cono, al fatto che tutta l'adrenalina riversata nelle vene surrenali viene distrutta prima di arrivare al sangue arterioso, ma al fatto che la quantità di adrenalina che con il sangue arterioso essi iniettavano nelle vene del cane reattivo, era così piccola da non poter dare in *questo animale* alcuna ben manifesta azione ipertensiva.

Non è necessario che io dica che con i risultati di queste mie ricerche non pretendo di aver aggiunto nulla alla conoscenza della natura ormonica dell'adrenalina, ma le mie esperienze, tuttavia, mi sembrano sufficienti a togliere alle conclusioni del GLEY la importanza che egli ha creduto darvi.

Indipendentemente dal valore dimostrativo che possono avere le esperienze del GLEY e le mie, mi par lecito asserire che il problema sulla natura ormonica dei prodotti di secrezione interna non può essere risolto con la sola sperimentazione fisiologica o farmacologica. E' a tutti noto come l'anatomia e la fisiologia comparata, la patologia e la clinica possano largamente concorrere a fornire quel complesso di prove e di dimostrazioni indispensabile a risolvere tali ardui problemi.

Fa meraviglia invero che a proposito delle proprie esperienze sull'adrenalina il GLEY abbia potuto scrivere che « per far cadere le nozioni attuali sulla funzione surrenale è stata sufficiente qualche esperienza concepita secondo la logica e il razionale concatenamento dei fatti » (1).

Sarebbe davvero assai comodo poter risolvere certe questioni con poche e semplici esperienze di Laboratorio. Non è certamente che io voglia togliere ad esse il loro valore come il più sicuro mezzo di indagine biologica, ma sarebbe d'altra parte imprudente di non tener conto dei dati positivi delle altre scienze sorelle.

(1) E. GLEY. *Quatre leçons sur les Secrétions internes.* Paris, Baillière et Fils, 1920, pg. 60 : « Pour ébranler les fondements des notions actuelles sur la fonction surrénale, il a suffi de quelques expériences conçues suivant la logique et d'après l'enchaînement rationnel des faits ; ces expériences auraient dû être réalisées depuis longtemps ».

ISTITUTO DI FARMACOLOGIA SPERIMENTALE DELLA R. UNIVERSITA DI GENOVA DIRETTO DAL PROF. A. BENEDICENTI.

Sulla formazione nell' organismo di composti della serie cloroformica per decomposizione di sostanze della forma CX_3 - CO - CO - NH - CO - NH_2

PER

DR. MARIO GARINO.

Aiuto all'Istituto di Chimica Generale della R. Università di Genova

Avendo avuto occasione anni addietro di studiare in questo Istituto il comportamento nell'organismo della tribromopiruvina (1) ed avendo riscontrata la sua facile scissione in bromoformio e conseguenti fenomeni di narcosi negli animali sottoposti alle esperienze, mi parve interessante preparare gli altri termini della serie trialogeno — piruvinica sinora non ancora preparati.

Sostituendo il cloro gradatamente ai tre atomi di bromo nella tribromo-piruvina, ottenni coi metodi brevemente esposti più avanti la monoclorodibromopiruvina, la dicloromonobromopiruvina e la tricloropiruvina. Introducendo l'iodio al posto di un atomo di cloro o di bromo ottenni la dicloromonojodopivurina e la dibromonojodopivurina. Con questo credevo di avere il mezzo di studiare, non solo il comportamento nell'organismo di queste sostanze ma anche quello dei diversi composti della forma CHX_3 (serie del cloroformio) non ancora studitai dal lato farmacologico ; i risultati delle esperienze furono però alquanto diversi da quelli previsti.

I termini di partenza per la preparazione dei composti di cui si tratta sono l'acido dicloropiruvico e l'acido dibromopiruvico. Il primo

(1) GARINO. — Sul comportamento nell'organismo della tribromopiruvina ecc. G. della R. Accademia di Medicina — Vol. XIX a. LXXVI serie 4. —

NOTA — Ringrazio sentitamente la Dott. ssa IRENE MUZIO per il valido e intelligente aiuto prestatomi sia nella preparazione dei composti, sia nelle esperienze per il loro studio farmacologico.

fu preparato facendo reagire una molecola di acido piruvico con due molecole di cloruro di solforile a blando calore. L'acido dicloropiruvico così ottenuto ha un punto di fusione di 57° ; è anidro ed è poco adatto alla preparazione della dicloropivureide, occorre quindi cristallizzarlo diverse volte dall'acqua sino ad avere un composto bianchissimo e avente un punto di fusione di 119°. Tale punto di fusione si raggiunge quando l'acido dicloropiruvico assume una molecola di acqua di cristallizzazione.

L'acido dibromopiruvico fu preparato facendo reagire direttamente l'acido piruvico col bromo aggiunto a poco a poco, a mite calore e a pressione ordinaria.

Trattando l'acido dicloropiruvico o l'acido dibromopiruvico con urea e acido solforico concentrato si ottiene rispettivamente la dicloro e la dibromopivureide.

Quest'ultima fu preparata col metodo di E. FISCHER (1).

Per la preparazione della prima, il metodo di maggior rendimento fu riscontrato il seguente : gr. 20 di acido dicloropiruvico cristallizzato con una molecola di acqua e avente un punto di fusione di 119° vengono disciolti in 120 gr. di acido solforico concentrato. La soluzione rimane incolora se l'acido dicloropiruvico è puro, vi si aggiungono gr. 20 di urea e si pone il tutto a. b. m. Dopo circa tre ore una certa quantità di cristalli si è separata in seno al liquido che si è fatto scuro e la reazione può considerarsi finita. Si versa il tutto in un bicchiere contenente circa 400 c.c. di acqua a poco a poco e agitando ; si separa una sostanza bianca finemente suddivisa che in capo a una o due ore si depone al fondo. Si decanta e si filtra alla pompa sino a scomparsa della reazione dell'acido solforico nelle acque di lavaggio.

Il rendimento oscilla attorno al 90 % dell'acido dicloropiruvico impiegato.

La dicloropivurina o dicloropivureide ha la seguente formula di costituzione :

```
C Cl2
|
C  — NH
|        \
|         CO
|        /
CO — NH
```

è poco solubile nell'acqua e nell'alcool a freddo, alquanto di più a caldo; fonde verso i 286° decomponendosi.

Dalla dicloro e dalla dibromopivureide si passa ai composti stu-

(1) Ann. d. Ch. — Harnstoffderivate der Dibrombrenztraubensaüre. vol. 239 p. 187 —

diati nella presente memoria introducendo direttamente un atomo di alogeno nella molecola.

La formula generale di tali composti è la seguente:

$$CX_3 - CO - CO - NH - CO - NH_2$$

dove X_3 sta al posto di tre atomi di un solo alogeno oppure di tre atomi di alogeni diversi (Cl, Br e I) nelle diverse combinazioni possibili.

In questa memoria non si parla del composto con tutti e tre gli alogeni nè di quelli con due atomi di I, perchè non mi è riuscito di preparare sinora l'ac. diiodopiruvico.

Il composto con tre atomi di iodio sarà impossibile a prepararsi perchè è facile prevederne l'estrema instabilità. La tricloropivurina si prepara facendo gorgogliare del cloro in una sospensione di gr. 10 di dicloropivureide in 500 c.c. di acqua calda (90—95°) sino a scomparsa del precipitato.

Lasciando raffreddare, dopo aver evaporato circa i due terzi del liquido, deposita una sostanza cristallizzata in belle lamelle lucenti. Dalle acque madri si può cristallizzare altra sostanza evaporando a mite calore o meglio ancora nel vuoto, ma il prodotto che si ottiene risulta alquanto colorato e impuro. Il rendimento è alquanto inferiore al teorico perchè il cloro a caldo brucia una parte della sostanza. Da 10 gr. di dicloropivureide si ottengono circa 9 di tricloropivurina.

In modo analogo si prepara la *dibromo-monocloropivurina* e anche in questo caso per la ragione esposta più sopra, il rendimento è inferiore al teorico e si avvicina al precedente.

La *dicloro — monobromopivurina* si prepara sospendendo la dicloropivureide nell'acqua di bromo bollente sino a completa soluzione. Il rendimento è di circa 140 % della dicloropivureide impiegata. Il teorico sarebbe 155 %.

Meno semplice fu la preparazione dei composti iodurati.

Dopo vari inutili tentativi riuscii a prepararli trattando la dicloro e la dibromopivureide con iodio sciolto in tetracloruro di carbonio e in presenza di acido iodico a caldo.

Gr. 10 di dicloropivureide, finemente polverati, si sospendono in circa 200 c.c. di soluzione acquosa di acido al 2 % in un pallone della capacità di circa 500 c.c., vi si aggiungono gr. 6 di iodio e 50 c.c. di tetracloruro di carbonio e si pone a b.m. con refrigerante a ricadere per 6-8 ore.

Il tetracloruro di carbonio ha il duplice scopo di non lasciare evaporare l'iodio e di mantenere la temperatura presso i 78° oltre la quale l'acido iodico manifesterebbe un'azione ossidante tanto energica da bruciare parte della sostanza.

L'acido iodico ha la duplice funzione di dare un ambiente acido in seno al quale difficilmente si altera il composto che viene formandosi e di distruggere l'acido iodidrico che si forma e che colla sua presenza farebbe retrocedere la reazione principale.

Quando la reazione è finita si ha una soluzione acquosa limpida pressocchè incolora sovrapposta a una soluzione di iodio in tetracloruro di carbonio Il tutto ancora caldo si versa in un imbuto a rubinetto per separare rapidamente la parte acquosa. Questa viene evaporata a mite calore (non sopra i 55°) a circa un terzo del suo volume e quindi lasciata raffreddare mantenendola sempre sotto una luce molto attenuata. Meglio è sempre ricorrere alla distillazione nel vuoto Cristallizza così una sostanza in belle lamelle soffici e lucenti di un leggero colore giallino ; si preme alla pompa, si lava con acqua distillata sino a scomparsa della reazione acida e si pone a seccare in istufa a mite calore. Quando la sostanza è asciutta si altera molto meno alla luce.

Le acque madri contengono ancora una parte di dicloromonoiodopivurina e gran parte dell'acido iodico adoperato e possono servire per altre successive preparazioni. Lo stesso dicasi della soluzione di iodio in tetracloruro di carbonio.

Un eccesso di iodio o di acido iodico non nuoce alla reazione. Il rendimento si avvicina molto al teorico ossia al 169, 61 % della dicloropivureide adoperata.

Un procedimento del tutto analogo serve per la preparazione della dibromonoiodopivurina il cui rendimento si avvicina anch'esso al teorico ossia al 147,21 % della dibromopivureide adoperata.

Nella tabella seguente sono esposti i dati medî delle analisi eseguite per identificare le diverse sostanze.

	N %		Cl %		Br %		I %	
	calc.	trov.	calc.	trov.	calc.	troc.	calc.	trov.
dicloropivureide	14,91	14,88	33,16	33,05	—	—	—	—
tricloropiruvina	11,99	12,20	45,61	45,79	—	—	—	—
dicloromonobromopivurina	10,07	10,27	25,53	25,70	28,74	28,66	—	—
monoclorodibromopivurina	8,65	8,87	11,02	11,20	49,92	50,19	—	—
dicloromonoiodopivurina	8,61	8,71	21,83	21,40	—	—	39,069	39,28
dibromomonoiodopivurina	6,76	6,95	—	—	38,63	38,75	30,67	30,39

Tutte queste sostanze sono insolubili nel benzolo, nell'etere di petrolio e nel tetracloruro di carbonio, ma si sciolgono alquanto nell'acqua e nell'etere e assai meglio nell'alcool come è indicato nella seguente tabella con dati approssimativi.

	Acqua		Alcool		Etere
	fredda.	boll.	fredda.	boll.	
tricloropivurina	1,5 %	4,5 %	25 %	50 %	5 %
dicloromonobromopivurina	1,0 %	4,0 %	15 %	45 %	3 %
monoclorodibromopivurina	0,5 %	2,5 % si altera	5 %	10 %	2 %
dicloromonoiodopivurina	1,5 %	4,0 %	20 %	45 %	3 %
dibromomonoiodopivurina	0,5 %	3,0 % si altera	8 %	20 %	2 %

Questi composti offrono delle bellissime reazioni dovute alla presenza del gruppo CX_3 — C

Scaldati con potassa e olio di anilina danno la ben nota reazione della fenilcarbilammina o isobenzonitrile.

$$C_6H_5NH_2 + CHX_3 + 3KOH = C_6H_5NH - C + 3KX + 3H_2O.$$

Si possono poi, entro certi limiti, distinguere fra di loro per la più o meno grande lentezza con cui reagiscono a freddo quando siano posti a contatto con potassa caustica e timolo polverato. La tribromopivurina colora istantaneamente la massa in un bel violetto tendente al rosso, la dibromocloro, la tricloro e la dibromoiodo cominciano a colorarsi dopo circa dieci minuti mentre la 2 Cl J impiega più di un'ora.

Mettendo β naftolo invece del timolo si ha una colorazione bleu tendente al verde.

Queste reazioni avvengono istantaneamente e in modo visibilissimo e duraturo (anche un paio di ore) con tutte queste sostanze, quando vengano triturate in mortaio insieme con gli accennati reattivi.

Tutte queste sostanze trattate con potassa alcoolica danno da prima il composto CHX_3 che da loro deriva e ossalurato di potassio; facendo bollire a lungo si ha formazione di formiato di potassio e di alogenuri alcalini

$$CHX_3 + 4KOH = 3KX + H\text{-}COOK + 2H_2O$$

Questa reazione può venire impiegata per il dosaggio quantitativo degli alogeni e il procedimento che ho seguito è il seguente :

gr. 0,2 — 0,25 di sostanza venivano pesati esattamente in un palloncino della capacità di circa 100 c.c., vi si aggiungono c.c. 40 di alcool a 95° e 10 c.c. di potassa caustica al 20 % in cui erano stati esattamente titolati i cloruri. Si teneva all' ebullizione con refrigerante

a ricadere per circa tre ore dopo di che gli alogeni contenuti nella sostanza in esame erano sicuramente trasformati in sali potassici e quindi si scacciava l'alcool per evaporazione aggiungendo un pezzetto di zinco per regolarizzare l'ebullizione della soluzione potassica.

Una semplice titolazione con $AgNO_3$ N/10 basta per identificare la 3 Cl pivurina perchè contiene un solo alogeno, ma nel caso di sostanze che contengono cloro e bromo occorre anche pesare il precipitato degli alogenuri d'argento e poi calcolare quanto dell'uno e quanto dell'altro è contenuto nella sostanza pesata.

La soluzione degli alogenuri alcalini da cui era stato scacciato l'alcool si acidifica nettamente con acido nitrico privo di cloruri. si filtra lavando con accurratezza il precipitato che si è formato per la prolungata ebullizione sino a scomparsa della reazione con nitrato d'argento nelle acque di lavaggio, quindi si aggiunge una quantità nota di $AgNO_3$ N/10 e si fa bollire per raggrumare il precipitato dopo di che si filtra per crogiuolo di Gooch, si secca e si pesa.

Si ottiene così un peso che indicheremo con p.

Indicando con x il peso del AgCl pesato e con y il peso del AgBr pure pesato nel crogiuolo, avremo :

$$p = x + y$$

Nel filtrato, convenientemente concentrato, si titola l'eccesso di $AgNO_3$ con solfocianato ammonico N/10 e adoperando solfato ferrico ammonico, privo di cloruri, per indicatore.

Si ottiene così il peso di nitrato di argento occorrente per precipitare tutto il cloro e il bromo della sostanza in esame e questo dato lo chiameremo con q.

Indicando ora con e la quantità di $AgNO_3$ necessaria per precipitare tutto il cloro e con e_1 la quantità necessaria per la precipitazione del bromo avremo :

$$q = e + e_1 \ .$$

Ora chiamiamo con a il rapporto $\frac{AgCl}{AgNO_3}$ e con b quello $\frac{AgBr}{AgNO_3}$ avremo :

$$a = \frac{AgCl}{AgNO_3} = \frac{x}{e} \qquad e \qquad b = \frac{AgBr}{AgNO_3} = \frac{y}{e_1}$$

da cui :

$$e = \frac{x}{a} \qquad e \qquad e_1 = \frac{y}{b}$$

e quindi :

$$q = \frac{x}{a} + \frac{y}{b}$$

risolvendo le due equazioni :

$$p = x + y$$

$$q = \frac{x}{a} + \frac{y}{b}$$

rispetto a x si arriva alla fomula :

$$x = \frac{abq - ap}{b - a}$$

il cui secondo membro contiene tutti i termini noti e permette così di calcolare il % rispettivo dei due alogeni contenuti nella molecola tenendo naturalmente conto della quantità di cloro introdotta con i 10 cc. di potassa caustica al 20 % impiegati.

Per i composti iodurati questi metodo non si può seguire perchè al momento di acidificare la soluzione acquosa degli alogenuri alcalini, una parte del iodio può venire spostata dall' ac. nitroso che quasi normalmente è contenuto nell'ac. nitrico. L'acido nitroso può invero essere distrutto aggiungendo all'ac. nitrico un poco di urea, ma io trovai più conveniente seguire un altro metodo per determinare l'iodio.

La soluzione acquosa da cui era stato cacciato completamente l'alcool, veniva quantitativamente travasata in una storta a tappo smerigliato la cui tubolatura, allungata e piegata a gomito, pescava in un palloncino contenente circa 10 cc. di ioduro potassico al 10 % convenientemente raffreddato. Vi si vervavano sopra 10 cc. di solfato ferrico-ammonico e 10 — 15 cc. di ac. solforico al 50 % e si faceva bollire sino a distillare il liquido a metà del suo volume. In queste condizioni solo lo iodio viene spostato mentre il cloro ed il bromo rimangono nelle storta.

$$Fe_2(SO_4)_3 + 2HI = 2FeSO_4 + K_2SO_4 + I_2$$

Lo iodio raccolto sul ioduro potassico veniva titolato con iposolfito sodico N/20 ; l'altro alogeno veniva direttamente titolato con nitrato d'argento N/10 nel liquido rimasto nella storta.

Per maggiori particolari sulla preparazione e sulla identificazione di queste sostanze si rimanda al lavoro che verrà quanto prima pubblicato sulla Gazzetta Chimica Italiana.

PARTE FARMACOLOGICA

Tutte le sostanze del tipo CX_3 — CO — CO — NH — CO — NH_2 di cui si è antecedentemente parlato hanno la proprietà di scindersi in altro composto della forma CHX_3 e in ossalurato alcalino quando

vengano trattati con alcali. Tale decomposizione è più facile per quelle sostanze che hanno nella loro molecola alogeni di peso molecolare più elevato. Così la tribromopiruvina è assai più facilmente decomponibile dagli alcali e dal calore che la tricloropiruvina e i termini intermedi tra l'una e l'altra sostanza presentano precisamente una facilità alla decomposizione che è intermedia anch' essa fra i due estremi e che va sempre più accentuandosi di mano in mano che il cloro viene sostituito dal bromo.

La tribromopivurina è decomposta dagli alcali diluiti e freddi e anche dall'acqua a circa 65°; la tricloropiruvina invece resiste all' ebullizione e all'azione degli alcali diluiti e f.eddi, trattendola però con alcali anche molto diluiti ma caldi iivela subito l'odore del cloroformio.

La scala di questa decomposizione è stata riscontrata anche nell' organismo.

I composti monoiodati presentano due decomposizioni possibili: una analoga a quella descritta sopra per cui si forma rispettivamente $CHCl_2I$ e $CHBr_2I$ (quest'ultima assai più facilmente della prima) per cui si stacca l'iodio della melecola dando luogo ad un altro composto che per ora non ho ancora bene identificato.

Tale ultimo decomposizione avviene spontaneamente alla luce con una certa rapidità specialmente se le sostanze si trovano in soluzione.

Nell'organismo pare che questa decomposizione abbia la prevalenza su quella che dà i composti della serie cloroformica e per questo ho ottenuti risultati assai diversi da quelli che attendevo dalle sostanze che ho preparate.

Tali risultati non mi sembrano privi d'interesse, ma portarono le ricerche su di un campo assai più vasto di quanto credevo e mentre pubblico i risultati preliminari mi riservo di condurle a termine in modo più completo in una prossima memoria.

Le diverse sostanze furono introdotte nell'organismo per via gastrica impastandole con del glucosio e valendomi di cavie e per vie endovenosa sciogliendole nella minima quantità possibile di acqua e valendomi di conigli.

Le iniezioni furono fatte parte nelle vene giugulari e parte nelle vene marginali dell'orecchio.

Per verificare la decomposizione delle sostanza nell'organismo e la conseguente scissione in composti della serie cloroformica, l'animale venne posto sotto una campana di vetro attraverso la quale si faceva circolare dell'aria che veniva poi fatta passare entro una canna riempita di pezzi di porcellana e scaldata a circa 400°.

I composti della forma CHX_3, si decompongono a tale temperatura secondo la nota reazione:

$$CHX_3 = C + XH + X_2$$

L'idracido e l'alogeno sosì liberato veniva fissato in una soluzione di nitrato d'argento N/10. Alla prima boccia di lavaggio se ne faceva seguire una seconda per precauzione ma non occorse mai di aver visto intorbidare il contenuto di quest'ultima.

A operazione finita si titolava l'eccesso di $AgNO_3$ con una soluzione N/10 di solfocianato di ammonio e si poteva così risalire alla quantità di CHX_3 eliminato per l'aria espirata.

ESPERIENZA SULLA « TRICLOROPIVURINA »

formula CCl_3 — CO — CO — NH — CO — NH_2 peso molecolare 233,5 punto di fusione 242° con svolgimento di gas e imbrunimento della sostanza.

I gr. di sostanza è capace di dare gr. 0, 5117 di cloroformio.
Nell'acqua si sciolgie circa all' 1,56 % a 15° e al 2,17 a 40°.

Esperienza prima

Ad una cavia del peso di gr. 680 somministro per via orale gr. 0.5 di sostanza.

Ore 11.1/2 l'animale viene posto sotto la campana.
Ore 12 si nota frequenza di respiro.
Ore 18 l'animale si trova giacente sul fianco, respirazione affannosa.
Tolto dalla campana e posto all'aria libera le condizioni non mutano. Sensibilità conservata. Si ripone sotto la campana.
Ore 18.30 l'animale giace sul fianco; respirazione frequente. Ogni tanto ha scosse e tremori e tenta inutilmente di sollevarsi.
Ore 22 perdura la respirazione frequente però estratto dalla campana si ripiglia in breve e mangia.

Il nitrato d'argento è appena intorbidato, si titolano gr 0,002 di Cl che corrispondono a gr. 0,0022 di cloroformio a gr. 0,0043 di 3 Cl pivurina.

Come si vede soltanto una piccola quantità di sostanza si è scissa nell'organismo

Raccolte le orine vi si riscontrò l'assenza di albumina.

Esperienza seconda.

L'esperienza fu ripetuta con dosi elevate somministrando ad una cavia del peso di gr. 360 gr. 1,10 di 3Cl pivurina capace di dare gr. 0,5629 di cloroformio, ma anche in questo caso solo una piccola parte di sostanza si è scissa.

L'animale fu tenuto sotto la campana per 24 ore. Nelle prime 12 si ebbe l'eliminazione di gr. 0,00637 di cloroformio pari a gr. 0,02899 di sostanza e nessunsegno di assopimento. Nelle successive 12 ore l'eliminazione di cloroformio fu minima, circa la decima parte della quantità eliminata nelle prime 12 ore. Le orine presentavano piccola quantità di albumina sino al terzo giorno in cui l'animale morì

Esperienza terza.

Ad un coniglio del peso di gr. 1650 vengono iniettati in una vena giugulare 30 cc. di una soluzione di 3Cl pivurina capace di svolgere gr. 0,266 di cloroformio.

Ore 11.1/2 l'animale è posto sotto la campana.

Ore 15 l'animale ha respirazione frequentissima. Il nitrato d'argento presenta appena un leggero intorbidamento.

Ore 19 l'animale presenta ancora respirazione frequente; ha il pelo irto.

Si titolano gr. 0,0025 di Cl pari a gr. 0,0028 di cloroformio e a gr. 0,0054 di 3Cl pivurina.

Esperienza quarta.

Ad un coniglio del peso di gr. 2220 circa vengono iniettati in una vena giugulare, circa un grammo di 3Cl pivurina e posto sotto la campana. Dopo otto ore viene estratto senza che abbia presentato alcun fenomeno degno di nota trarne una respirazione alquanto accellerata.

Si titolano gr. 0,0045 di cloro che corrispondono a gr. 0,0050 di cloroformio e a gr. 0,0097 di 3Cl pivurina.

Nelle orine si riscontrano piccole quantità di sostanza inalterata. Trattandole con potassa caustica e olio si anilina a caldo, l'odore della carbilammina è nettamente percettibile.

Distillando in corrente di vapore e ripetendo il saggio sul distillato non si ottiene questa reazione ciò che fa escludere la presenza di cloroformio libero nelle orine.

Si trovano piccole quantità di albumina e si escludono grandi quantità di ossalati.

ESPERIENZA SULLA « DICLOROMONOBROMOPIVURINA »

form. $CCl_2Br - CO - CO - NH - CO - NH_2$ peso mol. 278
p. f. 236° con svolgimento di gas e decomposizione della sostanza
1 gr. è capace di dare gr. 0,6043 di $CHCl_2Br$.
nell'acqua si scioglie circa all' 1,075 % a 15° e all' 1,42 % a 40°

Esperienza prima.

Ad una cavia del peso di gr. 500 vengono somministrati per bocca gr. 500 di 2ClBr pivurina capace di dare gr. 0,3021 di $CHCl_2Br$.

Dopo essere stato otto ore sotto la campana l'animale viene ritirato in condizioni pressocchè normali.

$AgNO_3$ N/10 consumato cc. 1 che corrisponde a gr. 0,0053 di $CHCl_2Br$ e a gr. 0,0092 di 2ClBr pivurina.

Le orine sorvegliate per due giorni presentarono piccole quantità di Br. inorganico, leggera albuminuria ed emoglobinuria.

L'emoglobinuria fu sempre riscontrata dopo che si era sottoposto lo stesso animale a più di una esperienza, ma non fu mai riscontrata per nessuna delle sostanze studiate in animali adoperati per la prima volta. Tale emoglobinuria durava dai 4 ai 5 giorni durante i quali andava gradatamente scemando sino a scomparire completamente.

Esperienza seconda.

L'esperienza ripetuta alla dose di gr. 3 prokilo diede risultati del tutto analoghi. Nelle prime dodici ore si ebbe l'eliminazione di gr. 0,0081 di $CHCl_2Br$ pari a gr. 0,0131 di 2ClBr pivurina.

L'albumina nelle orine si riscontrò sino dalle prime dodici ore dalla somministrazione della sostanza e andò sempre crescendo sino al terzo giorno in cui l'animale morì.

Si riscontrò pure la presenza di composti inorganici del bromo.

Esperienza terza.

Ad un coniglio del peso di gr. 2000 circa vengono iniettati in una vena marginale dell'orecchio cc. 68 di soluzione tepida all'1.5 % circa di 2 ClBr pivurina ossia circa gr. 1 di sostanza capace di dare grammi 0,6043 di $CHCl_2Br$.

Ore 11.1/2 l'animale è posto sotto la campana.

Ore 12.1/2 respirazione frequente e sonnolenza. Il nitrato d'argento comincia a intorbidare.

Ore 15 l'animale è completamente sveglio, ha respirazione frequentissima. Si raccolgono 30 cc. di orina fortemente colorata in rosso in cui si riscontra albumina ed emoglobina (l'animale era già stato adoperato per un'altra esperienza). Con potassa caustica e olio di anilina si mettono in evidenza piccole quantità di sostanza inalterata.

Facendo gorgogliare dell'aria attraverso alle orine e facendola poi passare nella canna a combustione non si potè svelare la presenza di $CHCl_2Br$ libero nelle orine.

Ore 21.1/2 l'animale viene estratto dalla campana in istato normale.

$AgNO_3$ N/10 consumato cc. 1,6 pari a gr. 0,0085 di $CHCl_2Br$ eliminati per le vie respiratorie ossia a gr. 0,0099 di 2ClBr pivurina decomposta.

Nelle orine sorvegliate per cinque giorni si riscontrarono traccie di sostanza primitiva nei primi quattro giorni insieme a quantità rilevanti di albumina che andarono via via scomparendo sino al quinto giorno in cui non si trovò più nulla di tutto questo.

ESPERIENZA SULLA « MONOCLORODIBROMOPIVURINA ».

form. $CClBr_2$ — CO — CO — NH — CO — NH_2 peso molecolare 322,5 p. f. 238° con svolgimento di gas e imbrunimento della sostanza. 1 gr. di sostanza è capace di dare gr. 0,6465 di $CHClBr_2$; nell'acqua si scioglie al 0,485 % circa a 15° e al 0,717 % circa a 40°.

Esperienza prima.

Ad una cavia del peso di gr. 630 vengono somministrati per via orale gr. 0,5 di sostanza capaci di dare gr. 0,3232 di $CHClBr_2$.

Ore 10 l'animale vien posto sotto la campana.

Ore 12 l'animale è sonnacchioso; ha respirazione frequente. Il nitrato d'argento intorbida leggermente.

Ore 18 l'animale viene estratto dalla campana. Rifiuta il cibo.

$AgNO_3$ N/10 consumato cc. 1,8 pari a gr. 0,016 di $CHClBr_2$ e a gr. 0,0247 di Cl_2Br pivurina.

Le orine sorvegliate per tre giorni diedero, fino al secondo compreso, presenza di bromo inorganico e di albumina.

Esperienza seconda.

L'esperienza fu rifatta somministrando ad una cavia del peso di gr. 450 gr. 1,50 di sostanza impastata con glucosio.

Ore 11.1/4 l'animale viene posto sotto la campana.

Ore 11.3/4 l'animale ha sonnolenza. Tiene gli occhi chiusi, non può tenere alto il capo.

Ore 14.1/2 l'animale si trova nello stesso stato di sonnolenza. Ha lacrime e secrezione di muco agli occhi. Il nitrato d'argento comincia ora ad intorbidare.

Ore 21.1/2 l'animale è sveglio, ha respirazione addominale e stentata.

L'eliminazione del $CHClBr_2$ continua ancora sebbene lentamente. Il mattino seguente l'animale fu trovato morto. Nelle orine si riscontrò Br inorganico e forti quantità di albumina.

Il $CHClBr_2$ eliminato per l'aria espirata risultò gr. 0,0192 pari a fr. 0,0297 di sostanza.

Esperienza terza.

Ad un coniglio del peso di gr. 1750 vengono iniettati in una vena marginale dell' orecchio cc. 105 di una soluzione tepida di Cl 2Br pivurina contenente circa gr. 0,9 di sostanza capace di dare gr. 0,5818 di $CHClBr_2$.

Durante l'iniezione si ha la narcosi dell'animale ma non completa, i riflessi non sono per niente aboliti.

Ore 12 l'animale viene posto sotto la campana in uno stato di profondo torpore. Respirazione molto lenta.

Ore 18 l'animale viene estratto dalla campana in condizioni pressocchè normali.

Si raccolgono orine contenenti forti quantità di emoglobina lo stesso animale era stato adoperato per altre esperienze del genere).

Piccole quantità di un composto della serie cloroformica si possono mettere in evidenza con la reazione della carbilammina ma non si può stabilire se questo composto si trovasse allo stato libero nelle orine o se si trattasse di piccole quantità di sostanza inalterata.

Al microscopio non si trovano globuli rossi, si trovano invece dei cristalli di ossalato di calcio.

La presenza di questo sale si può spiegare facilmente pensando che la Cl2Br pivurina dà nella sua scissione diclorobromometano e ac. ossalurico.

$AgNO_3$ N/10 consumato dall'aria espirata cc. 2,9 pari a gr. 0,0217 di $CHClBr_2$ e a gr. 0,0335 di sostanza.

Nelle orine si riscontrò emoglobina bromo inorganico e la reazio ne dei composti della serie cloroformica al primo e al secondo giorno; al terzo non si ebbe più la reazione della carbilammina e non c'era più traccia di emoglobina, perdurava soltanto il bromo sotto forma inorganica e l'albumina.

Circa le esperienze sul quarto termine della serie, la tribromopivurina, si rimanda al citato lavoro publicato sulla R. Accademia di Medicina dove sono riportate le esperienze dimostranti che questa sostanza è capace di scindersi nell'organismo in quantità tale da dare delle narcosi profonde e complete che possono durare anche più giorni (sino a settantaquattro ore).

ESPERIENZE SULLA « DICLOROMONOIODOPIVURINA ».

form. CCl_2I — CO — CO — NH — CO — NH_2 peso molec. 225,00 punto di fusione 230° con svolgimenti di gas e imbrunimento della sostanza.

Al di sotto dei 200° comincia a perdere iodio.

1 gr. di sostanza è capace di dare gr. 0,6895 di $CHCl_2I$ e gr. 0,3904 di I.

Nell'acqua si scioglie all'1,5 % circa a 15°.

Esperienza prima.

Ad una cavia del peso di gr. 550 vengono somministrati per bocca gr. 0,550 di sostanza.

L'animale lasciato per otto ore sotto la campana non ha presentato nulla di particolare, appena estratto si mostrava in ottime condizioni e prendeva il cibo con avidità.

Il nitrato d'argento era appena opalescente.

$AgNO_3$ consumato gr. 0,0051 pari a gr. 0,0021 di $CHCl_2I$ ossia Cl eliminato coll' aria espirata gr. 0,00071, I gr. 0,00127.

Le orine contenevano iodio inorganico in quantità rilevante sino al quarto giorno, nessuna traccia di sostanza primitiva nè di composti della forma $CHCl_2I$ o altri composti organici dell'iodio.

Per la determinazione dell'iodio ricorsi al seguente metodo. Una parte aliquota delle orine raccolte veniva messa in istorta con 5-10 cc. di allume ferrico al 10 % e 10 % e 10—20 cc. di acido solforico al 50 % e il tutto portato ad un volume di 100 cc. circa.

La tubolatura della storta allungata e piegata ad angolo si faceva pescare in un palloncino contenente 10 cc. di ioduro potassico al 10 % e convenientemente raffreddato quindi si distillavano circa 50 cc. di liquido. Insieme alle prime porzioni di acqua distilla, in queste condizioni, gran parte dell'iodio che raccolto sul ioduro di potassio veniva poi titolato con iposolfito sodico N/20.

Le ritolazioni dell'iodio diedero questi risultati:

1°	giorno :	gr.	0,0088
1°	» :	»	0,0380
3°	» :	»	0,0508
4°	» :	»	0,0076
	Totale	gr.	0,1052

5° giorno neanche traccie.

L'iodio ritrovato nelle orine rappresenta circa il 26,70 % del totale introdotto sotto forma di Cl I pivurina.

Esperienza seconda.

L'esperienza fu rifatta con dosi più elevate ed i risultati furono pressocchè eguali.

Ad una cavia del peso di gr. 540 vengono somministrati gr. 1,10 di 2 Cl I pivurina (circa gr. 0,8 pro kilo) capace di dare gr. 0; 6461 di $CHCl_2I$ e a gr. 0,4297 di I.

Non si è trovato traccia di precipitazione nel nitrato d'argento quindi fu esclusa l'eliminazione di $CHCl_2I$ per le vie respiratorie.

Fu riscontrato invece abbondantissimo l'iodio inorganico nelle orine fino al terzo giorno in cui l'animale morì.

Alla sezione si ebbero i seguenti caratteri:
peritoneo arrossato, fegato congesto, cuore vuoto di sangue, polmoni congesti, mucosa dello stomaco normale, sostanza corticale dei reni fortemente iperemica, bacinetti renali normali, capsule renali normali.

Esperienza terza.

Ad un coniglio del peso di gr. 1980 circa vengono iniettati nella cavità peritoneale circa cc. 67 di soluzione tepida all' 1,5 % di 2ClI pivurina capace di dare gr. 0,6461 di $CHCl_2I$ e gr. 0,3904 di I.

Alle ore 11.1/4 viene posto sotto la campana e ne viene estratto alle 18, 1/2 senza che nulla di notevole si sia osservato.

Il nitrato d'argento non è affatto intorbidato.

Si trova abbondantissimo nelle orine l'iodio inorganico. Assenti sostanza primitiva, composti della forma CHX_3, emoglobina ed albumina.

ESPERIENZE SULLA « DIBROMOIODOPIVURINA »

form. $CHBr_2I$ — CO — CO — NH — CO — NH_2 peso molec. 414,00 punto di fus. 197° con svolgimento di gas e imbrunimento della sostanza; fra i 110° e i 140° perde iodio.

I gr. di sostanza è capace di dare gr. 0,7240 di $CHBr_2I$ e gr. 0,3069 di iodio.

Nell'acqua si scioglie circa al 0,5 a 15° e all'I % a 40°.

Esperienza prima

Ore 11 — Ad una cavia del peso di gr. 655 vengono somministrati per via orale gr. 0,655 di 2Br I pivurina capace di dare gr. 0,4742 di CHBrI e gr. 0,2000 di iodio. Dopo un quarto d'ora circa che l'animale si trovava sotto la campana ebbe un breve periodo di eccitazione, possi calmò e cominciò ad assopirsi.

Ore 12 — l'animale tiene gli occhi chiusi, presenta la respirazione caratteristica del sonno con inspirazione lunga ed espirazione brevissima. Se si scuote si sveglia, ma subito ricomincia a dormire. Il nitrato d'argento non è ancora affatto intorbidato.

Ore 15.1/2 — L'animale si trova nello stesso stato di sonnolenza; presenta lacrimazione e secrezione di muco agli occhi.

Ore 16 — il nitrato d'argento comincia ora ad intorbidare, ma appena percettibilmente.

Ore 21.1/2 — l'eliminazione del $CHCl_2I$ con l'aria espirata è finita. Messo nuovo nitrato d'argento nella boccia di lavaggio non intorbida oltre.

L'animale viene estratto dalla campana; è torpido e sonnacchioso, però mangia con avidità, ha sempre un poco gli occhi lacrimosi.

Nelle orine raccolte e sorvegliate per cinque giorni, si riscontrò l'assenza di albumina e la presenza di iodio inorganico nei primi quattro giorni. L'iodio inorganico eliminato per le orine, dosato col metodo descritto dianzi nelle esperienze sulla dicloroiodopivurina, risultò gr. 0,1685 su gr. 0,2 somministrato.

Ricercato qualitativamente il bromo non se ne rinvennero che piccole traccie.

Dato che l'iodio rintracciato nelle orine corrispondeva a gr. 0,5492 di sostanza decomposta nell'organismo, si sarebbero dovuti trovare gr. 0,2121 di Br se la decomposizione della 2 Br I pivurina fosse avvenuta nel modo aspettato ossia avesse dato

luogo a $CHBr_2I$; una quantità così forte si sarebbe facilmente svelata all' analisi qualitativa. Per sincerarmi che il Br di questa sostanza non viene eliminato colle orine rifeci l'esperienza con più accuratezza.

Esperienza seconda.

Ad una cavia del peso di gr. 685 si somministrano per via orale gr. 0,685 di sostanza e si pone sotto la campana.

Questa quantità di 2 ClI pivurina può dare gr. 0,4959 di $CHCl_2I$, gr. 0,2646 di Br e gr. 0,2102 di iodio.

Tranne il periodo di eccitazione che in questa esperienza non fù notato, si ebbero fenomeni del tutto eguali a quelli precedenti.

Il nitrato d'argento cominciò ad intorbidare dopo cinque ore dalla somministrazione della sostanza, mentre l'animale fu colto da irresistibile sonnolenza quasi subito.

$AgNO_3$ N/10 consumato cc. 0,25 corrispondenti a gr. 0,0010 di iodio e a gr. 0,00128 di bromo.

Le orine sorvegliate per quattro giorni presentarono traccie di albumina, quantità rilevanti di iodio e soltanto traccie di bromo.

Il dosaggio dell'iodio, fatto col solito metodo diede questo risultato :

1° giorno	gr.	0,0152
2°	»	0,1194
3°	»	0,0378
Totale		0,1724

4° giorno neanche traccie.

gr. 0,1724 di iodio corrispondono a gr. 0,5617 di 2BrI pivurina e se questa sostanza si fosse scissa in $CHBr_2I$, insieme alla quantità di I trovata si dovevano dosare gr. 0,2169 di Br.

Il dosaggio di questo elemento fu fatto nel modo seguente :

radunati i residui della distillazione delle orine dei primi tre giorni in cui era già stato titolato il iodio, se ne trattò una parte aliquota (50 cc. sui 130 complessivi) con eccesso di nitrato d'argento e si fece bollire fino a che il precipitato formatosi apparve ben raggrumato, quindi, dopo averlo lavato non meno di dieci volte per decantazione adoperando per gli ultimi lavaggi acqua distillata, si pose a seccare in istufa. Si riprese con ac. nitrico concentrato e si fece bollire per circa dieci minuti.

In altre precedenti esperienze si aveva avuto occasione di notare che gli alogenuri d'argento precipitati in seno alle orine di animali a cui era stata somministrata qualcuna delle sostanze di cui si tratta, non erano ridotti dall'idrogeno nascente o erano ridotti solo in minima parte e ciò è forse dovuto alla presenza di albumina anche in piccola quantità. L'albuminato d'argento, irriducibile dall'idrogeno nascente, può formare una specie di corteccia di protezione attorno all'alogenuro e renderlo così inattaccabile.

Facendo bollire con ac. nitrico concentrato, la sostanza organica va distrutta e con acido solforico diluito e zinco si può liberare l'ac. cloridrico e l'ac. bromidrico legato all'argento.

Si ottiene così una soluzione contenente cloruro, bromuro e solfato di zinco con l'eccesso di ac. solforico e un precipitato costituito esclusivamente da argento ridotto. Si filtrò, si lavò accuratamente il precipitato sino a scomparsa della reazione del nitrato d'argento nel filtrato e poi vi si aggiungesero cc. 15 di $AgNO_3$ N/10 (compreso 1 cc. che era stato adoperato per saggiare il filtrato).

Questa seconda precipitazione degli alogeni è resa necessaria dal fatto che nell'orina, specialmente quando ha subito l'ebullizione con acidi concentrati, non è possibile dosare con esattezza l'eccesso di nitrato d'argento perchè si presenta fortemente colorata.

Si fece bollire per raggrumare il precipitato, si filtrò per crogiuolo di Gooch che si

pesò dopo averlo seccato a 115° e si ottenne così un peso di alogenuri d'argento di gr. 0,2112 costituito da gr. X di ClAg e da gr. Y di BrAg.

Nel filtrato, convenientemente concentrato, si titolò l'eccesso di $AgNO_3$ con cc. 0,9 di solfo-cianato di ammonio N/10.

Il peso dell' $AgNO_3$ necessario per precipitare il Cl e il Br. contenuto nel campione risultò quindi di gr. 0,2397.

Indicando rispettivamente con p e q i due dati ottenuti avremo :

$$p = x + y = 0,2112 \qquad e \qquad p = 0,2397$$

sostituendo questi due valori nella formula riportata a pag. 157 di questa memoria avremo, risolvendo rispetto ad x.

$$x = \frac{(ab \times 0,2397) - (a \times 0,2112)}{b - a}$$

ora essendo $a = \frac{AgCl}{AgNO_3} = \frac{0,2112}{169,7} = 0,8438.$

e $b = \frac{AgBr}{AgNO_3} = \frac{187,89}{169,97} = 1,1054$

avremo $ab = 0,9328$

$b - a = 0,2616$

Sostituendo questi valori nella formula citata avremo :

$$x = \frac{(0,9328 \times 0,2397) - (0,8438 \times 0,2112)}{0,2616} = 0,1739 \text{ di ClAg}$$

Sottraendo questa cifra dal peso totale degli alogenuri di argento pesati nel crogiuolo di Gooch si ottiene :

0,2112—1739 = 0,0373 di BrAg, pari a gr. 0,0158 di Br su 50 cc. di campione dei 130 totali.

Quindi in totale sarebbero stati eliminati gr. 0,0410 di Br invece dei gr. 0,1850 che si sarebbero dovuti avere se la sostanza somministrata si fosse scissa dando luogo a formazione di $CHBr_2I$.

Così si vede che mentre si può dosare l' 82 % dell'iodio introdotto non si può rintracciare che il 15,49 % circa del bromo,

Che si sia formato bromoiodoformio mi sembra però dimostrato dal tatto della sonnolenza dell'animale e dalla presenza di un poco di bromo nelle orine.

La rimanente quantità di bromo deve essere eliminata con le feci, parte sottoforma di 2 BrI pivurina inalterata e parte sotto forma di quel composto che si ottiene anche in vitro da questa sostanza quanda viene esposta umida o in soluzione ai raggi solari.

Di questo non ho potuto sincerarmi dato che non conosco per ora il metodo di separare questo composto dalla sostanza madre.

Nelle feci fu facile riscontrare presenza di sostanza inalterata.

Esperienza terza.

Dato che nella molecola della 2 BrI pivurina figurano alogeni di peso elevato mi attendevo da questa sostanza una facilità alla decomposizione in $CHBr_2I$ tale da avere delle narcosi complete negli animali a cui fosse stato immesso direttamente nelle vene una soluzione di queste sostanze, ma anche in queste condizioni ha la prevalenza la scissione che porta al distacco del solo iodio dalla molecola.

Ad un coniglio del peso di gr. 2035 vengono iniettati in una vena marginale dell' orecchio cc. 50 di soluzione tepida all'I % circa di 2 BrI pivurina.

L'animale non presentò durante le 24 ore, per cui rimase sotto la campana di vetro, fenomeni di narcosi, ma soltanto invincibile sonnolenza.

Il nitrato d'argento consumato dagli alogeni eliminati coll'aria espirata fu gr. 0,020 circa che corrispondono a gr. 0,0096 di CHBr2 I e a gr. 0,0133 di sostanza decomposta.

Nelle orine sorvegliate per cinque giorni si riscontrò albumina ed emoglobina (l'animale era già stato adoperato per altre esperienze) sostanza inalterata, iodio e bromo sotto forma inorganica.

La presenza di bromo inorganica nelle orine in quantità piuttosto rilevante in questo caso in cui maggiore fu l'eliminazione del bromoiodoformio per le vie respiratorie, dimostra che questo alogeno vi si ritrova quando la 2 Br I pivurina subisce la scissione nel composto della serie cloroformica.

Esperienza quarta.

Allo scopo di accertarsi quali fenomeni presenterebbe la sostanza se si scindesse nell'organismo in CHBr2 I fu iniettata in una vena marginale dell'orecchio di un coniglio del peso di Kgr. 2 circa, 30 cc. di soluzione satura di 2Br I pivurina preventivamente scaldata al di sopra degli 80° ossia sino a che fosse nettamente sensibile l'odore del bromoiodoformio.

Durante l'iniezione stessa l'animale cessa improvvisamente di respirare regolarmente e viene in fretta slegato. Si regge a stento per pochi momenti e poi cade in completa narcosi con abolizione totale dei riflessi

Ore 11,15 l'animale viene posto sotto la campana, presenta mucose arrossate.

Ore 11,50 l'animale fa qualche movimento, le mucose sono sempre più arrossate; ha muco alle narici. Respirazione profonda.

Ore 12,00 dopo pochi movimenti del capo pare riassopirsi.

Ore 12,30 comincia il risveglio che dopo circa un quarto d'ora appare completo.

L'animale si lascia ancora una mezz'ora sotto la campana e si attiva maggiormente la corrente d'aria perchè possa asportare tutto il CHBr2 I ancora presente nella campana stessa dopo di che viene rapidamente sostituita la bolla di Liebig contenente il nitrato d'argento.

Nella nuova bolla si formò una opalescenza appena percettibile nelle successive due ore in cui l'animale fu lasciato sotto la campana dimostrando con ciò che l'eliminazione del $CHBr_2I$ era finita e che tutto quello eliminato durante la narcosi era stato asportato.

Il precipitato formatosi risultò gr. 0,100 corrispondente a circa gr. 0,0048 di CHBr2I e l'analisi qualitativa rivelò la presenza sia del bromo che dell' iodio.

Il bromo inorganico trovato nelle orine era in quantità notevoli dimonstrando ancora una volta che la presenza di questo alogeno nelle orine è strettamente legato alla scissione della sostanza in $CHBr_2I$.

Fu fatta anche qualche esperienza preliminare sul $CHCl_2I$ e sul CHBrI liberi ottenuti per decomposizione della 2ClI pivurina e della 2BrI pivurina in presenza di carbonato sodico. Quantunque si presentassero interessanti ho dovuto per ora sospendere queste esperienze per non lasciarmi trasportare in un campo diverso da quello che avevo scelto per mio lavoro.

Questi composti della serie cloroformica hanno un odore dolciastro che ricorda rispettivamente quello del cloroformio e quello del bromo formio, misto ad un vago odore di iodoformio; si presentano sotto forma di liquidi pesanti u poco solubili nell'acqua fortemente altera-

bili specialmente alla luce. Per questo è difficile conservarli incolori e sono sempre più o meno colorati in violetto per l'iodio che mettono in libertà. Quando vengano cristallizzati dall' etere di petrolio diventano stabili e non perdono più iodiò.

Esperienza prima.

In una piccola scatola di vetro della capacità di circa 100 cc. dove è stata posta una rana, si fanno cadere due gocce di $CHCl_2I$ e si chiude col coperchio.

In meno di tre minuti l'animale è completamente narcotizzato, gli arti sono fortemente contratti ed incrociati come in una rana nicotinizzata.

Dopo circa mezz'ora comincia a risvegliarsi e dopo un altro quarto d'ora si risolleva se viene collacata sul dorso.

Esperienza seconda.

Nella scatola di vetro dove è stata posta una rana vengono versate due goccie di $CHBr_2I$.

Si ha subito un breve periodo di eccitazione seguito da completa immobilità.

Gli arti posteriori sono incrociati e presentano forti contrattureDopo circa mezz'ora comincia il risveglio, perdurano però ancora le contrazioni degli arti posteriori.

Dopo circa un'ora e mezza l'animale è tornato allo stato normale.

Esperienza terza.

In una rana del peso di circa 15 gr. viene iniettata circa una goccia di $CHBr_2I$.

Si nota subito una forte contrattura muscolare nel punto ove fu fatta l'iniezione e tale contrazione si estende prima agli arti inferiori e poi ai superiori in modo che l'animale viene a poggiare solo sul ventre.

Dopo un quarto d'ora dall'iniezione è ancora completamente irrigidita e assume l'aspetto di una rana tetanizzata.

Non si ha il risveglio ma la morte.

CONCLUSIONI.

Dalle esperienza citate si possono dedurre le seguenti conclusioni

1° = La 3Cl pivurina, la 2ClBr pivurina, la ClBr2 pivurina e la 3Br pivurina, composti dalla formula generale

$$CX_3 - CO - CO - NH - CO - NH_2$$

mostrano una facilità alla scissione in composti della serie cloroformica, sia in vitro sia nell'organismo, che è strettamente legata alla natura degli alogeni che fanno parte della molecola e tale scissione diventa sempre più facile di mano in mano che il bromo sostituisce il cloro. Nella tricloropivurina si ha appena un accenno di scissione, nella tribromopivurina si ha invece una formazione di bromoformio in quantità tale da provocare una vera e propria narcosi della durata di molte ore, (sino a 74 come nelle esperienze citate nella prima memoria).

2° = Per i composti della forma $CCl_2I - CO - CO - NH - CO - NH_2$ e $CBr_2I - CO - CO - NH - CO - NH_2$ la scissione della molecola avviene in modo diverso che nei precedenti.

Per la 2ClI pivurina non si ha quasi affatto eliminazione di composti della serie cloroformica per le vie respiratorie nè alcun segno esterno che ne faccia sospettare la produzione.

Per la 2BrI pivurina si ha una quantità maggiore di $CHBr_2I$ eliminato per l'aria espirata e lo stato di sonnolenza in cui cadono gli animali sottoposti alle esperienze dimostra come tale composto debba formarsi nell'organismo.

L'eliminazione di $CHBr_2I$ per le vie respiratorie si ha soltanto dopo tre ore circa dall'inizio dello stato di assopimento e cioè quando presumibilmente la produzione di tale composto è più accentuata. La gran parte di iodio e del bromo in esso contenuto invece che nell'aria espirata, si ritrova sotto forma inorganica nelle orine.

3° = Sia la 2 ClI pivurina che la 2BrI pivurina subiscono nell'organismo una scissione per cui lasciano in libertà l'iodio che viene eliminato sotto forma di sali inorganici attraverso i reni.

Per la 2ClI pivurina si ritrova nell' orina circa il 26,70 % dell' iodio totale introdotto.

Per la 2BrI pivurina si ritrova l' 82 % circa di iodio mentre non si ritrova che il 15,5 % del bromo il quale molto probabilmente passa nelle feci sotto forma di composto organico proveniente dalla sostanza madre e sinora non bene identificato. Nelle orine si troverebbe soltanto il bromo proveniente da quella parte di sostanza che ha subita la scissione in $CHBr_2I$.

4° = L'iodio introdotto con queste sostanze sotto forma organica si elimina a traverso l'organismo sotto forma inorganica senza lasciare gravi disturbi anche se somministrato in quantità abbastanza rilevanti. (gr. 0,25 pro kilo).

———

ISTITUTO DI FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E TERAPIA
DELLA R. U. DI MESSINA
DIRETTORE : PROF. G. VINCI.

Sull' avvelenamento per Carlina gummifera. Nota II — Ricerche farmacologiche sul principio attivo della Carlina gummifera (Atractylato di K) (1)

PER IL

Dr. LUIGI TOCCO
aiuto

I casi di avvelenamento, dei quali alcuni seguiti da morte, per ingestione di CARLINA g., osservati da diversi autori e da me (4), hanno richiamato l'attenzione di diversi sperimentatori sul principio attivo di questa pianta e sull'azione che esso può esercitare nell' organismo. Per quanto si sia fatto però le nostre conoscenze al riguardo sono ancora molto incomplete, forse per la difficoltà di avere a disposizione sostanza pura ed in quantità sufficiente.

Avendomi il Prof. ANGELICO gentilmente favorito una piccola quantità di atractylato di potassio, ho eseguito diverse ricerche farmacologiche, che sono oggetto di questa nota.

L'atractylato di potassio è una sostanza di colorito appena giallastro, cristallizzato in piccoli aghi prismatici, di sapore amaro astringente, che ricorda lontanamente la droga da cui proviene.

E' solubile in acqua a caldo nella proporzione del 2 % circa, formando una soluzione leggermente opalescente, di reazione spiccatamente acida.

E' quasi insolubile in etere, cloroformio, acetone ; solubile in alcool, specie se acquoso.

La natura chimica di questo sale non è esattamente definita : è un sale solfo-acido, che bruciato lascia il 20.8 % di solfato potassico ; scaldato in mezzo acido o alcalino diluito, si scinde in acido solforico, acido valerianico, un idrato di C e una sostanza complessa non ancora bene conosciuta.

---

(1) Comunicazione fatta al VI Congresso medico Siciliano. Palermo, 23-26 Aprile 1921.

Trattato con acido solforico concentrato emana odore di acido valerianico, e si forma un liquido di colore rosso-bruno che, lasciato all'aria o per aggiunta di acqua, diventa rapidamente violetto (LEFRANC).

Con acido solforico contenente tracce di una soluzione acquosa molto diluita di formaldeide dà colorazione azzurro-violacea per aggiunta di acqua (ANGELICO).

Con acido solforico e una soluzione acquosa di vaniglina o di piperonalio, si colora in rosso-fucsina (ANGELICO).

Con una soluzione acquosa di aldeide protocatecica ed acido solforico si colora in rosso-solferino (TOCCO).

***

AZIONE TOSSICA.

L'atractylato di potassio si mostra tossico per tutte le classi animali, ad eccezione degli invertebrati.

Data la piccola quantità di sostanza che avevo a mia disposizione, ho esperimentato sempre per via ipodermica, con soluzione acquosa al 2 %, sempre preparata di recente.

Pesci. — Sensibilissimi sono i pesci. Le esperienze furono condotte sul Carassius auratus.

Per dosi molto piccole (mg 3-5-10) di veleno iniettato sotto cute, dopo pochi minuti (3-5) gli animali si mostrano irrequieti ed agitati, vengono infine alla superficie, dove assumono una posizione verticale, orizzontale, o sopra un fianco. Se eccitati di tanto in tanto od anche volontariamente, tentano con movimenti delle pinne discendere nell' acqua e vi riescono in parte; ma come questi si arrestano, risalgono rapidamente e tornano a galla. Dopo circa nove, dieci ore, a secondo della dose, il pesce cade a fondo ; tenta con forza di pinne di risollevarsi, e finisce sempre col ricadere, finchè, dopo circa 17 ore, dall' iniezione, si rimette completamente ; si muove liberamente e mangia con avidità.

Ciò dipende dal fatto che la vescica natatoria, come nell'avvelenamento per picrotossina, all'inizio d'azione del farmaco si tende, senza che l'animale possa più comprimerla, in seguito si affloscia.

Durante l'avvelenamento l'animale emette feci in quantità. Non vi è assuefazione al farmaco: l'esperienza ripetuta sullo stesso animale a distanza di pochi giorni (2-3) ha dato sempre lo stesso risultato.

Rane. — LAZZARO (3) ha osservato che le rane si mostrano completamente refrattarie all'azione di questa sostanza, se si eccettua una leggiera iperestesia quando le dosi somministrate sono alte.

Per PITINI (esperienze riportate da ANGELICO (2)) l'atractylato di potassio è del tutto inattivo nelle rane.

Dalle mie esperienze sul *discoglossus pictus* risulta che veramente le rane mostrano lieve ipereccitabilità generale per dosi molto alte: sensibilmente influenzata però ne viene la funzione cardiaca.

Se si mette allo scoperto il cuore di una rana (discoglossus pictus) avvelenata con qualche centigrammo (2-4) di veleno sotto cute, si osserva che il numero delle pulsazioni è di molto diminuito, la diastole è prolungata, la sistole più energica.

Ritornerò più ampiamente su questo soggetto in un'altra nota.

Rettili. — Per dosi di parecchi centigrammi (2-4) di veleno iniettato sotto cute non si sono osservati nella Lacerta muralis e nel Congilus ocellatus fenomeni degni di nota, eccetto una leggiera eccitazione generale.

L'eliminazione del veleno avviene pronta per il rene e per il tubo gastro-enterico e dura a lungo (oltre 18 ore).

Uccelli. — Ho eseguito le ricerche tanto sopra uccellini (Emberitia cirlus) che piccioni.

Uccellini. — Piccole dosi di veleno (mg 5-10) per via ipodermica determinano nell'Emberitia cirlus (zigolo nero), dopo circa un quarto d'ora, dispnea intensa, convulsioni tonico-cloniche, perdita di escrementi prima solidi e poi liquidi.

L'animale muore dopo un' ora circa in preda a dispnea e convulsioni. Se la dose è stata molto forte, alle convulsioni succede paralisi. Il respiro si arresta di regola prima del cuore.

Piccioni. — La dose tossica mi è risultata di gr 0,20-0,25 per Kg sotto cute.

Dopo 15' dalla somministrazione del veleno compare rigurgito ripetuto ed ostinato, il respiro aumenta di frequenza, e dopo circa mezz' ora diventa fortemente dispnoico.

Si ha perdita di escrementi prima solidi e poi liquidi, nei quali è possibile svelare, trattando con aldeide protocatecica ed acido solforico, la presenza dell' atractylato di potassio, appena dopo 5'-10' dalla somministrazione del farmaco.

In seguito (dopo due ore) compaiono accessi di convulsioni clonico-toniche, intercalati da periodi più o meno brevi di riposo con dispnea intensissima e rigurgito.

Gli accessi convulsivi si fanno più frequenti, si presenta opistotono, e l'animale muore. Il respiro si arresta prima del cuore.

Mammiferi. — L'atractylato di potassio è molto tossico per i mammiferi. Già nella prima nota (4) ho riferito le mie osservazioni sugli ovini (capra, pecora).

Nei comuni animali da laboratorio, secondo PITINI, (2) la dose tossico-mortale, per via ipodermica, è per Kg di ctg 25 nel coniglio, di ctg 20 nella cavia e nel cane.

Io ho sperimentato per la stessa via su topi, cavie, conigli : la

dose tossico-mortale mi risulta alquanto più alta nei conigli (ctg 30-35 per Kg) ma non ho potuto fare ricerche sui cani data la scarsa quantità di sostanza di cui disponevo.

Nei topi, nelle cavie, e nei conigli l'avvelenamento presenta sempre la stessa sintomatologia. I sintomi insorgono di solito qualche ora dopo l'iniezione del farmaco e sono irrequietezza, facile eccitabilità, frequenza respiratoria; le cavie, dopo pochi minuti dall'iniezione, presentano diuresi. In seguito compare dispnea che diventa sempre più intensa. Gli accessi convulsivi esplodono al l'improvviso ; durante questi attacchi la respirazione diventa stertorea, con mimica respiratoria molto pronunziata. Le convulsioni, precedute nei conigli e nelle cavie da fibrillazione dei masseteri e trisma, sono clonico-toniche, a tipo epilettiforme, con opistotono, emprostotono; la temperatura si eleva di uno, due gradi. Nei periodi di quiete la dispnea rimane sempre intensa.

Per solito l'animale muore in una convulsione per arresto prima del respiro e poi del cuore.

Se la dose somministrata è molto forte, ad un breve periodo convulsivo, segue paralisi e morte.

***

AZIONE CUMULATIVA — ASSUEFAZIONE

Studiata l'azione tossica, ho creduto interessante indagare se l'uso continuo e prolungato di questa sostanza determina fenomeni di accumulo o di maggiore sensibilità dell' organismo alle dosi massime oppure se si stabiliva abitudine al veleno. Perciò ho somministrato per via ipodermica a piccioni, conigli e cavie quotidianamente e per molti giorni dosi modiche (1/4-1/6 della dose letale) di atractylato di potassio, che aumentavo (1/2-1/3 della dose letale) fino a raggiungere la dose minima mortale.

Dalle numerose esperienze praticate, tutte concordanti fra loro, e che non riporto per amore di brevità, risulta che :

1) Gli animali, per l'uso protratto di piccole dosi non presentano disturbi notevoli.

2) Per dosi medie (1/2-1/3 della dose letale) presentano leggiera irritabilità e qualche tremore fibrillare specie dei massateri nei conigli; rigurgito e leggera dispnea nei piccioni.

3) Gli animali si rimettono completamente, smettendo la somministrazione del farmaco.

4) Non ha luogo azione cumulativa, nè si stabiliscono fenomeni di assuefazione.

5) La morte avviene col noto quadro fenomenico dell' avvelenamento, allorchè si somministra la dose minima mortale.

ASSORBIMENTO — ELIMINAZIONE

Sul comportamento dell' atractylato di potassio dopo la sua introduzione nell' organismo non abbiamo dati sicuri sebbene se ne siano occupati altri A. A., che mi hanno preceduto in queste ricerche.

LAZZARO (3) dice : « Ho potuto assicurarmi che l'assorbimento dell' atractylina è lento per la via ipodermica, lentissimo per quella del tubo gastro-intestinale, ed ho anco notato che per quest'ultima via sono necessarie dosi elevatissime per ottenerne gli effetti. Ciò trova la sua spiegazione oltre che nel difficile assorbimento, nella rapida eliminazione d'essa, eliminazione che si fa in gran parte per i reni e fors'anco per lo stomaco ».

ANGELICO e PITINI (1) riscontrarono in animali, avvelenati per os, la presenza del veleno solo nel contenuto gastro-intestinale.

Ho creduto perciò opportuno lo studio di quest' argomento : vedere cioè se questa sostanza venga assorbita, in quanto tempo viene eliminata, e per quali vie.

Data la scarsa quantità di veleno di cui disponevo, non ho potuto fare esperienze su cani ma solo su cavie e conigli somministrando il veleno per via ipodermica (soluzione acquosa 2 $^0/_0$, preparata di recente) in dose una metà — due terzi della minima mortale.

Le urine erano ricavate per cateterismo di 5 in 5 minuti, per tutta la durata dell' esperimento.

La ricerca del veleno nelle urine era fatta direttamente, trattando in capsula di porcellana poche goccie di urina con qualche cristallino di aldeide protocatecica ed acido solforico concentrato : si aveva colore rosso-cremisi intenso. Le urine raccolte nei primi momenti dopo la somministrazione del farmaco, e quelle nelle quali la reazione si presentava dubbia, erano concentrate a b. m., estratte a caldo con alcool acquoso, chiarificate : evaporato l'alcool, sul residuo si praticava la reazione.

Allo stesso modo erano trattate le feci emesse durante l'esperienza.

Con questa reazione la ricerca del veleno nelle urine e nelle feci è facile e sicura, mentre le altre reazioni sopra citate si prestano poco bene, per il fatto che le urine normali, come pure l'albumina, la caseina, i succhi organici, danno delle reazioni che possono confondersi con quelle che presenta l'atractylato di K.

Riporto i protocolli di alcune esperienze :

Esperienza I. — Coniglia di gr. 650 : digiuna da 12 ore.

19-2 ore 10,15 — Si iniettano sotto cute ctg 12 di atractylato di K.

» 10,20 — Con cateterismo si ricavano alcuni cm^3 di urina che trattata con aldeide protocatecica ed acido solforico si colorano appena in rosso-cremisi.

» 10,25 — Le urine prelevate con cateterismo danno chiara la reazione del l'atractylato di K.

» 11, — Idem. L'animale si mostra agitato.

19-2 ore 11. — Reazione sempre manifesta nelle urine che si ricavano per cateterismo.
» 16. — Idem. Le feci emesse trattate col metodo sopra descritto presentano positiva la reazione dell' atractylato di K.
» 20 — Reazione sempre chiara nelle urine e nelle feci.
20-2- » 8 — Reazione positiva nelle urine emesse durante la notte.
» 9 — Reazione dubbia nelle urine.
» 10 — Reazione negativa nelle orine.

Esperienza II. — Cavia di g 160 : digiuna da 12 ore.
24-2 ore 9,50 — Vengono iniettati sotto cute tre ctg di atractylato di K.
» 9,53 — Le urine ottenute per espressione danno chiara la reazione del l'atractylato di K.
» 10,3 — Idem.
» 10,30 — Dispnea leggera. Leggere contrazioni dei masseteri. Positiva nelle urine la reazione dell' atractylato di K.
» 12 — L'animale è sempre irrequieto, irritabile. Reazione delle urine sempre positiva.
» 17 — L'animale s'è rimesso. Reazione delle urine sempre positiva. Emette feci, che trattate col solito metodo, danno chiara la reazione dell' atractylato di K.
25-2 » 7. — Nelle urine raccolte durante la notte è chiara la reazione del l'atractylato di K.
» 7,30 — Reazione dubbia nelle urine ottenute per espressione. Estraendo le urine con alcool acquoso (nel modo sopra indicato) la reazione è positiva.
» 8 — Reazione negativa tanto nelle feci che nelle urine.

Da queste esperienze e dalle numerose altre eseguite (e che non riporto per amore di brevità) risulta che è possibile mettere in evidenza nelle urine opportunamente trattate dei conigli e delle cavie l'atractylato di K., dopo tre- cinque minuti, negli escrementi dei piccioni dopo cinque minuti,

L'eliminazione avviene anche in piccola parte con le feci.

Nelle cavie e nei conigli digiuni da 12 ore e per dosi inferiori alla tossico-mortale la durata dell'eliminazione è di circa 24 ore. Nel piccione è sempre non meno di 24 ore.



SCINDIBILITA DEL FARMACO IN VITRO E IN VIVO.

Dalle ricerche di ANGELICO e PITINI (1) risulta che l'atractylato di potassio ha una molecola resistente alla putrefazione oltre 20 giorni; resiste bene in soluzione acquosa od alcoolica all'ebollizione ripetuta, ma si scinde presto, se è trattato con acidi diluiti od alcali a caldo, eliminando acido valerianico e solforico, un idrato di C ed una sostanza che non dà la reazione di LEFRANC con acido solforico, ed è inattiva sugli animali.

Secondo PITINI (5) l'atractylato somministrato per os nei cani

viene assorbito e subisce negli organi trasformazioni identiche a quelle osservate per il farmaco in vitro.

Egli infatti riscontró negli estratti ottenuti dai vari organi di cani avvelenati per os un prodotto di scissione, che chiamò A, il quale ha comuni con l'atractylato di K le altre reazioni (vanillina, piperonalio, acido solforico; acido solforico, aldeide formica), ma non dà la reazione di LEFRANC — come non la dà il prodotto di scissione ottenuto in vitro — ed è inattivo negli animali da esperimento.

Comunicherò in altra nota le mie ricerche, appena ultimate, sul comportamento, in vitro della molecola dell'atractylato di K, dalle quali risulta che non è tanto resistente quanto si crede.

Negli animali ho esperimentato su conigli, cavie e piccioni, e ho cercato d'indagare se l'atractylato si elimina per le urine come tale oppure sotto forma di un prodotto di scissione inattivo, che non dà la reazione di Lefranc. (Prodottó A di Pitini).

Dopo qualche esperienza ho dovuto abbandonare la speranza di potere identificare per via chimica il prodotto di eliminazione, giacchè le stesse urine normali danno con H^2SO^4 una reazione di colore che si confonde con quella dell' atractylato di K, e a me non è stato possibile ricuperare dalle urine il prodotto eliminato senza che questo contenesse sostanze estrattive.

Ho cercato perciò di identificarlo ricorrendo alla reazione biologica, servendomi come reattivi del piccione, cavia, uccellino, topo: animali sensibili all' atractylato, indifferenti al prodotto di scissione.

Le urine di conigli e cavie, e gli escrementi di piccioni, avvelenati con dose forte di atractylato di K per via ipodermica erano raccolte, finchè non davano più la reazione del veleno, evaporate a b. m., ed estratte ripetute volte con alcool acquoso.

La soluzione idro-alcoolica veniva filtrata, chiarificata, concentrata a b. m. ripresa con acqua e filtrata, una piccola quantità del filtrato veniva iniettato sotto cute a piccoli animali (topi, cavie, uccellini).

Riporto i protocolli di alcune esperienze:

Esperienza III. — Coniglia di g 2000.

24-3 ore 8 — Si pratica un' iniezione di 10 cm^3 di soluzione acquosa al 2% di atractylato di K.

» 8,30 — l'animale è alquanto irrequieto. Di mezz' ora in mezz' ora si raccolgono le urine che trattate con acido solforico ed aldeide protocatecica presentano intensa la reazione del veleno.

» 16 — Reazione delle urine negativa.

Le urine vengono trattate col metodo sopra descritto. Una piccola parte del filtrato viene iniettata in una Emberitia cirlus che muore un' ora dopo con dispnea intensa e forti convulsioni.

Trattando le feci, il rene, il sangue, il cervello, e gli altri organi dell' uccellino con acido solforico ed aldeide protocatecica si ottiene intensa la reazione dell' atractylato di K.

Esperienza IV. — Piccione di g 410.
26-3-ore 10 — Vengono iniettati 4 cm^3 della soluzione acquosa al 2 % = ctg 8 di atractylato di K (dose tossico-mortale per il piccione).
» 11 — Rigurgito frequente e ripetuto. Emette escrementi solidi.
» 12 — Rigurgito e dispnea intensa. Emette feci liquide.
» 12,20 — Dispnea e convulsioni intense.
12,48 — Muore in preda a convulsioni.

Le feci solide e liquide sono raccolte in capsula di porcellana e trattate col metodo suddetto. Una parte piccola del filtrato viene iniettata ad un topolino domestico che muore dopo due ore con dispnea intensa e convulsioni.
Tutti gli organi e tessuti del topolino trattati con acido solforico ed aldeide protocatecica danno intensa la reazione dell' atractylato di K.

Dalle mie esperienze risulta quindi che l'atractylato di potassio, somministrato per via ipodermica agli animali da esperimento, viene eliminato come tale o come un prodotto di scissione tossico: infatti il prodotto di eliminazione ricuperato dalle urine dei conigli e dagli escrementi dei piccioni, conduce a morte, con la sintomatologia caratteristica di questo avvelenamento, i piccoli animali nei quali venga iniettato; e negli organi, nei tessuti, nelle secrezioni di questi è sempre possibile dimostrare la presenza del veleno.

***

DIFFUSIONE E RICERCA TOSSICOLOGICA DEL VELENO NEGLI ORGANI.

Le esperienze sulla diffusione e sulla ricerca del veleno negli organi si limitano a quelle di ANGELICO e PITINI, (1) i quali dimostrarono la presenza dell' Atractylato di K nel contenuto gastrico ed intestinale di animali avvelenati per os, ed a quelle di PITINI, (5) il quale, sempre in animali avvelenati per os, trovò un prodotto di scissione dell' atractylato di K (prodotto A), previa estrazione, negli altri organi.

Ho creduto perciò opportuno far uno studio accurato, una ricerca sistematica della diffusione dell' atractylato nei diversi organi e liquidi dell' organismo di animali avvelenati per via ipodermica, tanto più che queste ricerche avrebbero potuto avere importante applicazione pratica, nei casi di ricerca dell' atractylato di K negli avvelenamenti.

Il metodo seguito è il seguente: gli animali (piccione, cavie, conigli) ricevevano per via ipodermica quantità variabile di veleno (una metà — una dose tossico-mortale) in soluzione acquosa al 2 %, sempre preparata di recente e quando non morivano, venivano sacrificati, dopo un tempo variabile, per dissanguamento; i diversi organi, lavati in toto con acqua distillata, la cistifellea legata ed asportata in toto, il liquido cefalo-rachidiano aspirato con siringa ad

ago sottile attraverso la membrana occipito-atlantoidea messa allo scoperto ; l'umore acqueo aspirato mediante un sottile ago dalla camera anteriore dell' occhio.

Per la ricerca dell' atractylato una quantità di organo veniva in capsulina di porcellana leggermente tritata con bacchettina di vetro, ripresa con acqua, filtrata, e portata ad un dato volume. Su questa soluzione si faceva agire l'aldeide protocatecica e l'acido solforico e si paragonava la colorazione ottenuta con quelle di soluzione-campioni titolate di atractylato, trattate ugualmente. Cosi poteva dedursi approssimativamente il contenuto in atractylato dei diversi organi.

Quando il liquido da esaminare non era limpido, come la bile, si scolorava con carbone animale.

Con questo metodo, senza mai dover ricorrere ad estrazione, o concentrazione ecc., ho potuto avere la dimostrazione del veleno in modo facile e sicuro nella maggior parte degli organi ; in altri ho ottenuto una reazione debole, ma sempre evidente.

Indicheró le reazioni ottenute nelle esperienze, che per amor di brevità riassumo in quadro, con reazione intensissima (ii) ; reazione intensa (i) ; reazione debole (d).

TABELLA DELLA DIFFUSIONE DELL' ATRACTYLATO DI K NEI DIVERSI ORGANI E TESSUTI

(conigli, cavie, topi, piccioni, uccellini).

Animale	Peso gr.	Dose del veleno ctgr.	Animale sacrificato dopo ore	Sangue	Stomaco e contenuto	Intestino e contenuto	Reni	Urina o escrementi uccelli	Fegato	Bile	Pancreas	Milza	Polmone	Cuore	Muscoli	Testicoli	Ovaie	Cervello	Midollo spinale	Liquido cefalo-rachidiano	Umore acqueo
Coniglio	600	18	7	ii	d	i	ii	ii	i	ii	d	d	d	d	d	i	—	ii	ii	i	ii
Coniglio	650	20	6	ii	d	i	ii	ii	i	ii	d	d	d	d	d	i	—	ii	ii	i	ii
Coniglia	500	8	8	ii	d	i	ii	ii	i	ii	d	d	d	d	d	—	i	ii	ii	i	ii
Coniglio	800	12	8	ii	d	i	ii	ii	i	ii	d	d	d	d	d	i	—	ii	ii	i	ii
Cavia m.	160	5	6	ii	d	i	ii	ii	i	ii	d	d	d	d	d	i	—	ii	ii	i	ii
Cavia f.	200	6	5	ii	d	i	ii	ii	i	ii	d	d	d	d	d	—	i	ii	ii	i	ii
Cavia m.	180	3	6	ii	d	i	ii	ii	i	ii	d	d	d	d	d	i	—	ii	ii	i	ii
Topo	23	2	4	ii	d	i	ii	ii	i	ii	d	d	d	d	d	i	—	ii	ii	—	ii
Piccione	360	13	6	ii	d	i	ii	ii	i	—	—	—	d	d	d	i	—	ii	ii	—	ii
Piccione	400	10	5	ii	d	i	ii	ii	i	—	—	—	d	d	d	i	—	ii	ii	—	ii
Piccione	390	6	4	ii	d	i	ii	ii	i	—	—	—	d	d	d	—	—	ii	ii	—	ii
Uccellino	20	2	1	ii	d	i	ii	ii	i	ii	—	—	d	d	d	—	—	ii	ii	—	ii
Uccellino	25	3	2	ii	d	i	ii	ii	i	ii	—	—	d	d	d	—	—	ii	ii	—	ii

Com' è evidente dalla superiore tavola riassuntiva delle esperienze fatte, l'atractylato di K si trova presente in tutti gli organi e liquidi dell' organismo indistintamente ; in maggior copia nell' urina, bile, reni, intestino, fegato, sangue, testicolo, cervello ; in minor quantità negli altri organi esaminati: cuore, pancreas, milza, muscoli. In altre parole gli organi escretori, il sangue ed il cervello ne contengono una quantità relativamente maggiore.

***

SEDE DI AZIONE.

Solamente LAZZARO (3) nel 1894 fece un' esperienza sopra un cane, per stabilire la sede di azione dell' atractylato di K. Avendo osservato che, nell' animale operato da 24 ore di sezione del midollo spinale tra la sesta e la settima vertebra dorsale, le convulsioni si limitavano al treno anteriore e alla testa, mentre il midollo al di sotto del taglio conservava la sua funzionalità, come lo dimostrava il fatto che un' iniezione di stricnina provocava un accesso stricnico tipico, venne alla conclusione che il midollo spinale non è per nulla influenzato dall' atractylato di potassio, il quale invece spiega azione bulbo-cerebrale.

Si rendevano necessarie ulteriori ricerche anco in altri animali per precisare la sede di azione della sostanza.

Agisce essa sul bulbo o sui centri motori corticali oppure su entrambe queste parti del sistema nervoso centrale ?

A questo scopo ho istituito su cavie, conigli e piccioni tre serie di esperienze :

In una prima serie ho sezionato il midollo spinale ora prima ed ora dopo somministrazione del veleno per via ipodermica, istituendo anco ricerche di confronto con la stricnina. In una seconda serie ho studiato l'azione dell' atractylato di potassio sopra animali scervellati sia di recente che da alcuni giorni.

In una terza serie infine ho applicato direttamente la sostanza sul cervello ; oppure ho iniettato il veleno sotto le meningi di animali, nei quali avevo praticata una piccolissima breccia nel cranio, appena necessaria a permettere l'introduzione dell' ago.

Riporto i protocolli di alcune esperienze eseguite :

Esperienza V. — Cavia di g 500.

ore 9,45 — Iniezione sottocutanea di ctg 10 di atractylato di K.

» 16 — Dispnea intensa — convulsioni generali.

» 16,3 — Sezione del midollo spinale fra la quarta e la quinta vertebra dorsale. La parte posteriore del corpo dell' animale resta immobile : con leggeri eccitamenti meccanici si provocano dei movimenti riflessi.

Dispnea sempre intensissima.

ore 16,10 — Persistono le convulsioni del capo e del treno anteriore. Gli arti posteriori sono immobili : con l'eccitamento meccanico si provocano dei movimenti riflessi.
» 16,15 — Continuano le convulsioni degli arti anteriori e del capo.
Treno posteriore immobile.
Dispnea sempre intensissima.
S'iniettano sotto cute mg 2 di nitrato di stricnima.
» 16,25 — Convulsioni generali stricniche, come in animale a midollo integro.
» 16,30 — L'animale muore con convulsioni generali.
All' autopsia si osserva sezione completa del midollo spinale fra la 4a e la 5a vertebra dorsale.

Esperienza VI. — Coniglio di g 510.
ore 9,50 — Iniezione sottocutanea di ctg 15 di atractylato di K.
» 12 — L'animale si mostra agitato. — Dispnea.
» 12,30 — Dispnea sempre più intensa. Convulsioni in tutto il corpo.
» 12,35 — Continuano le convulsioni e la dispnea.
Sezione del midollo spinale tra la quarta e la quinta vertebra dorsale.
» 12,40 — Convulsione del capo e degli arti anteriori. Dispnea. La parte posteriore del corpo resta immobile e con l'eccitamento si provocano solo dei movimenti riflessi.
» 12,45 — Convulsioni limitate al treno anteriore : treno posteriore immobile.
Dispnea intensissima.
» 12,46 — Continuano le convulsioni limitate al treno anteriore.
S'iniettano sotto cute mg 0,5 di nitrato di stricnina.
» 12,55 — Convulsioni generali di tutto il corpo come in animale a midollo integro.
» 12,57 — Convulsioni generali. L'animale muore.
All'autopsia si osserva sezione completa del midollo spinale tra la quarta e la quinta vertebra dorsale.

Esperienza VII. — Piccione di g 320.
ore 10,30 — S'iniettano sotto cute ctg 10 di atractylato di K.
» 11,45 — Rigurgito frequente. Dispnea intensa.
» 11,50 — Continua il rigurgito infrenabile e la dispnea.
» 11,52 — Convulsioni generali per tutto il corpo. Movimenti disordinati di volo. Opistotono.
» 11,55 — Convulsioni generali sempre più intense.
Si pratica la sezione del midollo spinale tra la quinta e la sesta vertebra dorsale.
» 11,58 — Convulsioni localizzate alla testa ed alle ali. Arti posteriori immobili : coll' eccitamento si provocano solo dei movimenti riflessi.
» 12 — Convulsioni limitate al treno anteriore : treno posteriore immobile.
» 12,3 — Continuano le convulsioni limitate alla testa ed alle ali.
S'iniettano sotto cute mg 2 di nitrato di stricnina.
» 12,13 — Convulsioni generali di tutto il corpo come in animale a midollo spinale integro.
» 12,15 — L'animale muore in convulsione.
All' autopsia si riscontra la sezione completa del midollo spinale tra la quinta e la sesta vertebra costale.

Esperienza VIII. — Piccione g 410.
ore 9 — Si seziona il midollo spinale tra la quinta e sesta vertebra dorsale. L'animale ha il treno posteriore immobile e si trascina battendo le ali. Coll'eccitamento degli arti inferiori si provocano solo dei movimenti riflessi esagerati.

ore 11,30 — S'iniettano sotto cute ctg 13 di atractylato di K.
» 13 — Rigurgito frequente. Dispnea.
» 13,5 — Rigurgito e dispnea. Il treno posteriore, eccitato, reagisce con movimenti riflessi.
» 13,10 — Convulsioni localizzate alle ali ed alla testa. Movimenti disordinati di volo. Treno posteriore immobile: eccitato, reagisce con movimenti riflessi.
» 13,13 — Continuano le convulsioni limitate al treno anteriore: treno posteriore immobile.
S'iniettano sotto cute mg 2 di nitrato di stricnina.
» 13,23 — Convulsioni generali di tutto il corpo, a tipo stricnico, come se l'animale avesse il midollo integro.
» 13,26 — L'animale muore in convulsione.
All' autopsia si trova il midollo spinale completamente sezionato.

Esperienza IX. — Piccione di g 310. Da tre giorni è tenuto a digiuno completo.
ore 15 — Si asporta il cervello.
» 15,30 — S'iniettano sotto cute ctg 12 di atractylato di K.
» 16 — Rigurgito.
» 17,30 — Rigurgito e dispnea.
» 17,50 — Dispnea intensa.
» 18,30 — L'animale muore senza avere presentato convulsioni.

Esperienza X. — Piccione di g 320. Da tre giorni è tenuto a digiuno completo.
21-2 ore — Viene asportato il cervello. Nei giorni seguenti l'animale viene imbeccato.
25-2 » 9 — S'iniettano sotto cute ctg 13 di atractylato
» 10, — Rigurgito
» 10,30 — Rigurgito frequente e dispnea.
» 11 — Dispnea intensa.
» 11,30 — L'animale muore senza avere avuto la minima convulsione.

Esperienza XI. — Cavia di g 390 —
ore 9 — S'incide la cute del capo e si pratica con lo scalpello una piccoal breccia nella scatola cranica.
» 9,10 — S'inietta sotto le meningi una goccia di soluzione acquosa di atractylato di K al 2 %, preparata di recente. Si chiude la breccia con cera molle.
» 9,13 — L'animale si abbandona a fuga disordinata. Ogni minimo rumore lo mette in allarme e fugge, urtando negli ostacoli. Nella corsa è assalito da convulsioni clonico-toniche. Dispnea.
» 9,15 — Quando le convulsioni cessano, l'animale si dà alla fuga, ma sopraggiungono tosto altre convulsioni. Nei periodi di quiete si mostra fortemente eccitato. Dispnea intensa.
» 9,30 — Convulsioni clonico-toniche. Dispnea.
» 9,35 — Dispnea intensa. Convulsioni clonico-toniche, che permangono ininterrotte sino alle ore 13, quando la cavia muore.

Esperienza XII. — Coniglio di g 580.
ore 8 — S'incide la cute del capo e si pratica con lo scalpello una piccola breccia nella volta del cranio.
» 8,10 — S'inietta sotto le meningi una goccia di soluzione acquosa di atractylato di K. Si ottura la breccia con cera molle.
» 8,12 — L'animale tende le orecchie e fugge per la stanza urtando contro i mobili, saltando disordinatamente. Durante la corsa viene assalito da convulsioni tonico-cloniche, opistotono, e dispnea nei periodi di riposo.

ore 8,15 — Le convulsioni si succedono rapidamente, alternate a brevissimi periodi di riposo in cui l'animale presenta opistotono e dispnea intensissima.

» 9 — Le convulsioni assumono un carattere tonico e tali si mantengono sino alla morte dell' animale, che avviene alle ore 13.

Esperienza XIII. — Piccione di g 400.

ore 14 — S'incide la cute del capo e con lo scalpello si pratica una breccia piccolissima, tale che permetta l'introduzione dell' ago, nelle ossa craniche.

» 14,5 — S'inietta sotto le meningi una goccia di soluzione acquosa di atractylato di K. Si tampona con poca cera molle.

» 14,7 — Movimenti disordinati di volo — corsa sfrenata — movimenti di rotazione su se stesso — opistotono. Durante un volo è assalito da convulsioni e cade dibattendosi violentemente. Dispnea intensa.

» 15 — Le convulsioni si susseguono alternate da brevi periodi di riposo in cui si notano nell' animale opistotono, dispnea intensa e tentativi di fuga. Tale stato permane fino alla morte del piccione che avviene alle ore 18,30.

Con la prima serie di queste ricerche resta confermato il risultato della esperienza di LAZZARO sul cane, che il midollo spinale non è influenzato dall'atractylato di K. Su conigli, cavie e piccioni non esplica alcuna azione nella parte del midollo spinale privata dalle sue comunicazioni bulbari.

Dalla seconda e terza serie di esperienze non rimane alcun dubbio che l'atractylato agisce, oltre che sul bulbo, come lo provano la dispnea intensa e il rigurgito, prevalentemente sulla zona psico-motoria. I piccioni scervellati muoiono senza presentare convulsioni; e, per applicazione diretta del veleno sulla corteccia cerebrale, insorgono violenti convulsioni.

***

AZIONE SULLA FUNZIONE RENALE

Non è nota l'influenza dell'atractylato di K sull'apparato renale.

Io (4) aveva osservato negli avvelenati per ingestione di Carlina g. ritenzione d'urina od anuria : dopo svuotata la vescica col cateterismo, non si riusciva ad ottenere per molto tempo nuova urina.

Nelle mie esperienze su conigli e cavie aveva notato emissione d'urina durante il primo periodo dell'avvelenamento, e poi diminuzione talora fino all'arresto completo.

Ho creduto quindi necessario ricercare quale influenza esercita questo solfo-acido sulla funzione renale, e se, eliminandosi in gran parte per i reni, induca alterazioni in questo importantissimo organo.

A tal fine ho misurato il quantitativo d'urine emesse in un dato tempo prima e dopo la somministrazione per via ipodermica di atractylato di K in animali (cani, conigli) con cannula negli ureteri, in

vicinanza del loro sbocco in vescica, e, in alcune esperienze, al loro inizio alle pelvi, per eliminare il dubbio che l'anuria dipendesse da spasmo degli ureteri.

Riporto il protocollo di una delle esperienze eseguite :

Esperienza XIV. — Coniglio del peso di Kg. 2.

ore 10 — Introduco due cannule di vetro negli ureteri, al loro inizio alle pelvi.
» 11,40 — In dieci minuti escono dalla cannula sinistra dodici goccie d'urina ; dalla destra 14.
» 12,30 — Da entrambe le cannule fuoriescono 15 goccie d'urina in 10 minuti.
» 12,50 — S'iniettano sotto cute ctg 60 di atractylato di K.
» 13,35 — Da entrambe le cannule escono 17 goccie di urina ogni dieci minuti.
» 15 — Da entrambe le cannule escono 7 goccie d'urina ogni 10 minuti.
» 15,30 — La secrezione dell' urina s'è completamente arrestata, e tale permane fino alla morte dell' animale.

In altre mie esperienze ho sottoposto ad esame chimico e microscopico le urine, e ad esame istologico il rene.

Gli animali (conigli e cavie) sono stati avvelenati con dosi forti o tossico-letali di atractylato di K per via ipodermica.

Le urine venivano ricavate per cateterismo o per espressione della vescica, e il residuo si otteneva per centrifucazione. I reni venivano fissati nel liquido di Ciaccio, inclusi in paraffina, e le sezioni colorate con emallume-eosina.

Nelle urine si riscontra sempre : albumina in traccie, numerose cellule in degenerazione torbida, qualche cilindro granuloso, leucociti.

All'esame istologico il rene si mostra leso specialmente nella sostanza corticale. I vasi sanguigni sono turgidi, le anse glomerulari fortemente ripiene, l'epitelio delle capsule in qualche punto staccato, la cavità glomerulare contiene talvolta dell'essudato amorfo. Le cellule dei tuboli contorti si presentano rigonfiati, con i nuclei poco colorati, alcune in degenerazione, spesso staccate dalla membrana basale. Meno intense sono le lesioni nella parte midollare del rene.

Con queste ricerche viene sperimentalmente dimostrato il fatto osservato da me (4) nell'uomo che nell'avvelenamento da atractylato di K la secrezione dell'urina è leggermente aumentata in un primo tempo, del tutto arrestata in seguito.

Le alterazioni riscontrate nelle urine e nel rene dimostrano che quest'organo viene leso dall'atractylato durante la sua eliminazione. Si ha una nefrite tossica.



CONCLUSIONI

Da quanto sopra è stato esposto si può concludere :

1° L'atractylato di potassio è letale per i comuni mammiferi da esperimento, come lasciava supporre l'osservazione di avvelenamenti per Carlina g. nell'uomo e negli ovini.

E' tossico per gli uccelli e per i pesci.

Si mostra inattivo negli invertebrati.

Le rane per forti dosi hanno lievi fatti generali, mentre molto influenzato ne resta il cuore.

2° Somministrato a piccole dosi per molti giorni a conigli, cavie e piccioni non soggiace ad azione cumulativa, nè determina fenomeni di assuefazione.

3° Per via ipodermica viene rapidamente assorbito ed eliminato come tale, o come un prodotto di scissione tossico, perchè ricavato dalle urine ed iniettato a topi, piccioni e cavie porta a morte gli animali con la sintomatologia nota di quest'avvelenamento.

4° L'eliminazione ha luogo per la maggior parte per le urine, nelle quali è possibile metterlo in evidenza dopo 3'-5' dalla somministrazione e dura 22-24 ore. Una parte viene emessa con le feci.

5° Negli animali avvelenati l'atractylato si trova presente in tutti gli organi e liquidi dell'organismo indistintamente ; in maggior copia nelle secrezioni e negli organi secretori, nel sangue e nel cervello.

6° L'atractylato di potassio non esplica alcun'azione sul midollo spinale : è un veleno convulsivante a sede bulbo-cerebrale.

7° La secrezione renale viene prima leggermente aumentata, poi diminuita ed anche arrestata. Il rene viene leso dal veleno e si stabilisce una nefrite tossica.

BIBLIOGRAFIA.

1. — ANGELICO e PITINI. — Ricerche tossicologiche sul principio dell' Atractylis gummifera. Arch. di Farm. e Terap, XII, 377, 1906. — Gazzetta Chim. Ital, XXXVII, 446.

2. — ANGELICO. — Sui principi dell' Atractylis gummifera. Gazzetta Chim. Ital. XL, 403, 1910. — Arch. di Farm. e Terap., vol XIII, 91, 1907.

3. — LAZZARO.— Ricerche sperimentali sul principio attivo della Carlina acaulis. Arch. di Farm. e Terap., II, 325, 1894.

4. — E. L. TOCCO. — Sull' avvelenamento per Carlina gummifera. Riforma Medica, XXXVI, N 33.

5. — A. PITINI. — Ricerca dei prodotti di scissione dell' Atractylina nell' organismo animale. Arch. di Farm. e Scienze aff., XXIX, 88, 1920.

R. ISTITUTO DI STUDI SUPERIORI DI FIRENZE. LABORATORIO DI MATERIA MEDICA DIRETTO DAL PROF. G. CORONEDI
ISTITUTO FARMACOTERAPICO LOMBARDO DI BUSTO ARSIZIO (MILANO).

Intorno ad un nuovo composto della esametilentetramina con l'acido solfosalicilico

NOTA DEL

DOTTOR LAMBERTO CORRIDI

Malgrado siano numerosi i medicamenti proposti nella terapia delle malattie delle vie urinarie e quantunque molto si sia sperimentato e scritto su questi, è giuocoforza convenire, che il problema dell'antisepsi urinaria è ancora oggi ben lontano da una soddisfacente risoluzione. Infatti tutti i medicamenti in uso, mentre dimostrano un' efficacia dubbia ed incostante, procurano assai spesso gravi irritazioni renali, non disgiunti da disturbi molesti del tubo gastro-enterico: così i balsamici ed i derivati dell'acido salicilico: la stessa urotropina che oggi può dirsi il rimedio che ha, più di tutti, il favore del pubblico medico, non va esente da questa grave menda. Si aggiunga a proposito di quest'ultima, che ancora oggi ferve il dibattito sul suo meccanismo di azione: infatti mentre alcuni sperimentatori (LOEBISCH, CASPER, SUTER, HOFFMANN, STERN, VINDEVOGEL, ORLOVISKI ecc.) sostengono che le proprietà curative della urotropina dipendono dalla sua scissione nell'organismo in ammoniaca e aldeide formica con successiva eliminazione di questà colle urine, altri (CAMMIDGE, GROSGLICK, GAETZL, SALÚS, BERTI, CORRIDI) lo negano non avendo mai potuto rilevare nelle urine la presenza di aldeide formica.

In questo stato di cose, ritengo utile riferire in succinto i risultati sperimentali ottenuti con un nuovo composto della urotropina con l'acido solfosalicilico (1): questo nuovo prodotto fu ottenuto con l'intendimento di avere un rimedio che unisse le proprietà curative della esametilentetramina a quelle dell'acido salicilico, reso innocuo per l'introduzione nella sua molecola del gruppo solfonico. Esso ha la formula seguente

$$[(CH_2)_6 N_4]_2 SO_3 HC_6 H_3 (OH) COOH$$

risultando, dunque, di due molecole di urotropina unite ad una di acido

(1) Il solfo-salicilato di esametilentetramina che è oggetto di questa nota, fu ottenuto nel 1920 dal chimico *Dott. Mario Corridi.*

solfosalicilico. Si presenta come una polvere cristallina bianca, solubilissima nell'àcqua a cui conferisce un sapore acidulo piacevole: è invece quasi insolubile nell' alcool e nell'etere ; contiene i 56.2 % di urotropina.

Prima di riferire i risultati delle mie esperienze, dirò brevemente della tecnica seguita nelle indagini. Mi preoccupai anzitutto della scelta di un metodo sicuro e sensibile, atto a svelare le piccole quantità di aldeide formica. E' noto che moltissimi sono i metodi proposti per questa ricerca: ricordo il reattivo di LEBBIN, quello di JORISSEN, quello di BAJER e TOLLENS, quello di TRILLAT, quello di SCHIFF ed infine quello di KOBERT. Molti di questi, peccano per scarsa sensibilità ed alcuni anche per mancanza di specificità : senza dubbio il migliore tra questi è il reattivo di KOBERT, come già hanno dimostrato gli studi del FILIPPI, POLLACCI, e ROVASIO. Il reattivo va preparato al momento dell'uso, sciogliendo qualche cristallo di code-ina in acido solforico concentrato : se ne versa una piccola quantità in una provetta, facendo poi cadere il liquido da esaminare e cercando che i due liquidi non si mescolino : se vi è presenza di aldeide formica nel punto di contatto, si forma un anello di un bel colore viola. Ma un'altra reazione, proposta dal RIMINI nel 1898, è senza dubbio più sensibile della precedente : al liquido da esaminare si aggiungono 1-2 c.c. di una soluzione al 0.50 % di cloridrato di fenilidrazina e successivamente qualche cristallo di nitroprussiato sodico : dopo avere agitato, vi si versano lentamente alcuni c.c. di idrato sodico al 10 % : in presenza di aldeide formica si ha la comparsa di una bella colorazione azzurra fugace che si cambia tosto in nero e poi in verde e finalmente in giallastro. In prove di confronto col reattivo di KOBERT, agendo con soluzioni via via decrescenti di aldeide formica, ho potuto stabilire in modo indubbio, la maggiore sensibilità del reattivo di RIMINI. Nelle mie ricerche perciò ho preferito senz'altro quest'ultimo metodo, non trascurando però di eseguire anche la reazione di KOBERT. A proposito anzi di questa, debbo aggiungere che ricercando l'aldeide formica in soluzioni contenenti urotropina ò prodotti simili, é necessario per dichiarare la prova positiva, che la colorazione viola compaia subito, giacchè una comparsa tardiva di questa, dipende dalla scissione della urotropina nei suoi componenti per opera dell'acido solforico.

Prima di eseguire le esperienze, mi assicurai che la soluzione acquosa del nuovo prodotto non desse coi reattivi RIMINI e KOBERT le colorazioni caratteristiche e che invece trattata con acqua di bromo mostrasse il noto precipitato fioccoso giallo-aranciato : di questo metodo mi giovai per la ricerca nei liquidi, del medicamento in studio.

Studiando dapprima il comportamento del solfosalicilato di urotropina rispetto al calore, stabilii che le soluzioni di questo, poste in termostato a 38°, danno dopo soli 15' evidente la reazione RIMINI. In prove di confronto con l'elmitolo e l'urotropina, mentre col primo non ho avuto profonde differenze di comportamento, giacchè la sua

scissione avvenne sempre dopo 20', colla seconda inveve ho costantemente rilevato che anche dopo una permanenza in termostato di 24 ore non si notano tracce di aldeide formica.

Le soluzioni del nuovo composto in presenza di acido cloridrico nella proporzione del 2 ‰ e alla temperatura ambiente, rivelano prestissimo sviluppo di aldeide formica: al contrario le sue soluzioni debolmente alcalinizzate e poste in termostato a 38°, si mantengono inalterate anche dopo 20 ore.

Dopo queste ricerche preliminari ho studiato il valore antisettico del nuovo prodotto: anzitutto ne ho stabilito il potere antifermentativo in confronto a quello della urotropina. Allo scopo aggiunsi ad urine acide mantenute alle temperatura ambiente (26°-27°) piccole quantità dei due medicamenti. Senza riferire i dettagli delle ripetute esperienze, dirò che col composto solfo-salicilico ho potuto conservare inalterate le urine (reazione acida), per ben 21 giorni, mentre con l'urotropina già dopo due giorni esse mostravano evidente reazione alcalina. Analoghi vantaggi di azione ottenni stabilendo il momento di comparsa della fermentazione ammoniacale nelle urine di soggetti a cui furono somministrati per bocca i due medicamenti.

Per stabilire poi il potere antiputrefattivo del nuovo composto, ho usato infusi di organi (rene, milza) in soluzione fisiologica al 0.85 %, sangue e bile, prendendone 25 c.c. ed aggiungendovi successivamente 5 c.c. di soluzione di solfosalicilato di urotropina al 5 %: colla stessa tecnica ho eseguito esperienze di confronto colla urotropina: i liquidi in esame vennero esposti all'aria. Senza riferire i vari protocolli di esperienza, dirò brevemente che anche in queste prove il nuovo composto si è dimostrato di gran lunga più attivo della urotropina: mentre infatti con questa non ho notato sensibili e costanti differenze dalle esperienze in bianco, col primo invece ho potuto rilevare un ritardo di vari giorni alla comparsa della putrefazione: questa infatti ritardò sei giorni pel sangue, quattro per la milza, due per la bile e per il rene.

Per lo studio del potere antisettico della urotropina, elmitolo ecc. gli A.A. consigliano nelle prove batteriologiche dirette, di aggiungere la sostanza ai terreni di cultura sia prima della loro sterilizzazione (MULLER) sia dopo questa ed alla temperatura di fusione dei terreni nutritivi (ROVASIO), osservando poi se questi si mostrano inadatti allo sviluppo dei vari germi o quanto meno se il loro attecchimento avviene in ritardo e meno rigoglioso. Nel caso mio, proponendomi di stabilire il potere antisettico diretto del nuovo composto della urotropina, non potei usare nè l'uno nè l'altro metodo, per la già notata instabilità di questo, che libera aldeide formica anche se esposto a temperature medie. Ho preferito invece limitarmi ad alcune ricerche condotte col metodo seguente, senza nascondermi però che anche la tecnica da me usata non regge ad una critica sottile. Ho preparato tre campioni della stessa urina, di cui due contenevano rispettivamente

il 0,20 % del composto in studio e il 0,20 % di urotropina: il terzo servì di controllo. Dai tre campioni prelevai alcune gocce di urina e le passai in piastre di agar che posi in termostato a 38°. In ripetute esperienze del genere, potei constatare sempre che, mentre la piastra controllo presentava presto numerose colonie bacteriche, quella della urotropina ne presentava minor numero e con sviluppo ritardato e quella del composto solfo-salicilico ne conteneva un numero assai minore (circa la metà) di quello della urotropina e si sviluppavano assai più tardi.

Successivamente studiai il valore tossico del solfosalicilato di urotropina, sperimentando su rane e conigli. Gr. 6,15 del medicamento per gr. 1000 di peso corporeo, sominístrati alla rana esculenta per iniezione nel sacco linfatico dorsale, in più riprese e nell' intervallo di quattro ore, sono ben tollerati dall'animale: al contrario la stessa dose propinata in due sole volte ed in un'ora, riesce letale: la morte avviene assai rapidamente (2 ore circa) ed è accompagnata da scosse muscolari tonico-cloniche.

In una prima serie di esperienze sul coniglio, usai dosi piccole e protratte del medicamento, somministrato per via ipodermica: gli animali vennero giornalmente nutriti con la stessa qualità e quantità di alimenti. Dalle Tavole N° 1 e 2 che riportano due esperienze del genere, risulta che le dosi piccole e protratte sono benissimo tollerate: ne fanno fede l'aumento del peso corporeo e la mancanza di fatti anche lievi di irritazione renale e di ogni altro disturbo generale. Sulle altre osservazioni che riguardano la reazione delle urine e la eliminazione con queste di aldeide formica, tornerò fra breve. In una seconda serie ho sominístrato per bocca a conigli sani dosi forti e via via crescenti di solfosalicilato di urotropina. Per brevità riferisco nella Tav. N° 3 il dettaglio di una sola esperienza; da questa rilevasi che solo raggiungendo dosi equivalenti a gr. 2 per gr. 1000 di peso corporeo, si hanno fatti di irritazione renale (oliguria, albuminuria, ematuria, cilindruria) e disturbi generali (dimagramento). E' necessario però osservare che cessando la somministrazione, in brevissimo tempo gli animali riprendono il loro completo benessere. In ultimo ad alcuni conigli ho propinato per bocca una sola dose massiva del composto solfo-salicilico, raggiungendo in alcuni di essi la dose di gr. 5 per gr. 1000 di peso corporeo, somministrato in due volte alla distanza di un'ora. Nella Tav. N° 4 riferisco i dettagli di una esperienza del genere. In queste ricerche ho constatato sempre che la somministrazione del medicamento è seguita da lieve aumento della eccitabilità riflessa; le urine si fanno scarse, cotengono albumina, sangue e cilindri; gli animali dimagrano e rifiutano il cibo e molto spesso hanno diarrea; questi disturbi però non sono di lunga durata giacchè in ogni caso, in sei-otto giorni l'animale non ha più alcun disturbo e le urine hanno ripreso la loro normale composizione.

Per studiare l'eliminazione del solfosalicilato di urotropina attraverso il rene, somministrai ad individui sani per bocca ed a stomaco vuoto, gr. 1 del prodotto, ricercando nelle urine la comparsa della reazione caratteristica con l'acqua di bromo. Nelle numerose prove eseguite i risultati furono concordi : già dopo un'ora dalla somministrazione s'inizia la eliminazione che si protrae per 20-21 ora : alla 24*a* ora la reazione con acqua di bromo riesce negativa.

Si sa che l'azione terapeutica, dell'urotropina, elmitolo ecc. è fondata sulla produzione di aldeide formica la quale agirebbe come attivo antisettico : sono note anche le divergenze dei vari A.A. sulla possibilità o meno di detta scissione e sul momento nel quale questa avverrebbe : si aggiunga che la questione è anche legata alla sorte che subisce nell'organismo l'aldeide formica e su questo punto i pareri sono discordi, ritenendosi da alcuni che essa si elimini per le urine inalterata (FILIPPI) mentre secondo altri (PËRRANDO) verrebbe ossidata in acido formico a contatto del sangue e dei tessuti. Nelle mie esperienze sul solfosalicilato di urotropina, mi sono limitato a ricercare nelle urine degli animali da esperienza (conigli) e degli uomini sani, cui erano state somministrate dosi diverse del medicamento, l'aldeide formica servendomi dei due metodi di RIMINI e di KOBERT. Nell' uomo ad apparecchio urinario integro, non si ha comparsa di aldeide formica nelle urine dopo somministrazione per bocca di dosi piccole (gr. 0,50-1) : al contrario dosi più elevate (gr. 3-4), somministratise frazionatamente provocano, in un certo numero di casi, evidentemente positiva la reazione RIMINI ; la reazione di KOBERT fu in ogni caso negativa. La discordanza fra le due reazioni ci è spiegata dalla molto maggiore sensibilità della prima, che è capace di rivelarci quantità assai piccole di aldeide ed io credo che si debba logicamente ritenere che anche nei qasi in cui la reazione RIMINI fu negativa, si avesse eliminazione di aldeide ma, per speciale comportamento individuale, in quantità così piccole che il reattivo non era capace di svelare. Incidentalmente faccio notare che negli uomini a cui somministrai dosi assai elevate del nuovo composto (4 gr. pro die) non mi fu mai dato osservare alcun fatto sia pur lieve di irritazione renale e mancò anche ogni disturbo a carico del tubo gastro-enterico : in ogni caso invece fu notato un aumento considerevole della quantità delle urine Per le esperienze sui conigli rimando alle Tav/ 1, 2, 3, 4, osservando solo che i risultati non sono dissimili da quelli ottenuti nell' uomo : specialmente in seguito a dosi forti fu notata l'eliminazione colle urine di aldeide formica : inoltre di particolare interesse mi sembra il rilievo fatto, circa la reazione delle urine la quale, dopo la somministrazione, diviene spiccatamente acida. Anche nei conigli fu osservato un sensibile aumento della urinazione.

CONCLUSIONI

I risultati delle prove farmacologiche eseguite, mi autorizzano a concludere che il solfosalicilato di urotropina, preso in studio, è poco tossico e ben tollerato dall'organismo: in dosi terapeutiche protratte, non da alcun disturbo gastrico e nessun fatto anche lieve di irritazione renale: è dotato di un buon potere antisettico, superiore certamente a quello della urotropina. In seguito al suo uso la urinazione si fa più abbondante e le urine, se alcaline, divengono presto acide: non vi ha chi non veda il valore del duplice reperto: mentre, infatti, l'uno aumenta la disinfezione meccanica delle vie urinarie detergendo più completamente e più spesso le parti ammalate, l'altro offre il migliore ostacolo all'attecchimento dei germi patogeni.

Infine le esperienze mi inducono a ritenere che il nuovo composto, libera nell'organismo, aldeide formica che si elimina inalterata, sia pure in piccole quantità, colle urine: infatti l'avere ottenuto la reazione RIMINI positiva, nei casi in cui la somministrazione del medicamento fu più abbondante, fa supporre che anche nelle prove con dosi piccole, in cui mancò il reperto della formaldeide nell'urine, si avesse eliminazione di questa, ma in quantità così scarsa da sfuggire ai nostri mezzi di indagine. D'altronde non sarebbe, io credo, pregio di un antisettico delle vie urinarie, quello di cedere forti quantità di formaldeide per i pericoli ai quali questa esporrebbe i malati.

Firenze, agosto 1921.

CONIGLIO SANO.

TAV. I

Data	Peso corporeo gr.	Solfosalicilato di urotropina gr.	ESAME URINE						Osservazioni
			Quantità c.c.	Reazione	Albumina	Reaz.-Rimini	Reaz.-Kobert	Reaz.-acqua di Br.	
10 Settembre	1840	—	60	alcalina	assente	assente	assente	assente	
11 »	1880	—	84	»	»	»	»	»	
12 »	1880	—	48	»	»	»	»	»	
13 »	1840	0.35	85	»	»	»	»	»	Nessun disturbo
14 »	1890	0.35	120	»	»	»	»	positiva	»
15 »	1890	0.35	180	»	»	»	»	»	»
16 »	1940	0.35	40	acida	»	»	»	»	»
17 »	1900	0.35	60	»	»	positiva	»	»	»
18 »	1960	0.35	88	»	»	»	»	»	»
19 »	1975	0.35	96	alcalina	»	dubbia	»	»	»
20 »	1960	0.35	96	»	»	assente	»	»	»
21 »	1960	0.35	42	»	»	»	»	»	»
22 »	2040	0.35	92	»	»	»	»	»	»
23 »	1940	0.35	70	»	»	»	»	»	»

CONIGLIO SANO

TAV. 2

Data	Peso corporeo gr.	Solfosalicilato di urotropina gr.	ESAME URINE						Osservazioni
			Quantità cc.	Reazione	Albumina	Reaz. Rimini	Reaz. Kobert	Reaz. acqua di Br.	
25 Settembre	1780	—	88	alcalina	assente	assente	assente	assente	
26 »	1850	—	70	»	»	»	»	»	
27 »	1815	—	38	»	»	»	»	»	
28 »	1910	0,35	48	»	»	»	»	»	nessun disturbo
29 »	1910	0,35	150	»	»	»	»	positiva	»
30 »	1885	0,35	250	»	»	»	»	»	»
1 Ottobre	1920	0,35	96	»	»	»	»	»	»
2 »	1950	0,35	28	acida	»	positiva	»	»	»
3 »	1925	0.35	188	»	»	assente	»	»	»
4 »	1920	0.35	144	alcalina	»	»	»	»	»
5 »	1960	0.35	96	»	»	»	»	»	»
6 »	1935	0.35	130	»	»	»	»	»	»
7 »	1990	0.35	130	»	»	»	»	»	»
8 »	1920	0.35	56	»	»	»	»	»	»
9 »	1920	0.35	160	»	»	»	»	»	»

CONIGLIO SANO.

TAV. 3

Data	Peso corporeo gr.	Solfosalicilato di urotropina gr.	Solfosalicilato di urotropina pro Kgr.	ESAME URINE Quantità c. c.	ESAME URINE Reazione	ESAME URINE Albumina	ESAME URINE Reazione Rimini	ESAME URINE Reazione Kobert	ESAME URINE Reazione acqua di Br.	Osservazioni
28 Luglio	1990	—	—	120	alcalina	assente	assente	assente	assente	
29 »	1940	—	—	102	»	»	»	»	»	
30 »	1940	0.95	0.50	98	»	»		»	»	
31 »	1845	1.84	1	75	»	»	»	»	positiva	Nessun dist.
1 Agosto	1860	2.79	1.50	77	acida	»	positiva	»	»	» »
2 »	1860	3.72	2	50	»	presente	»	»	»	Ha rifiutato parte del cibo.
3 »	1805	4.51	2.50	42	»	»	»	»	»	Ha rifiutato il cibo. Ematur. cilindruria.
4 »	1810	—		40	»	»	»	»	»	
5 »	1910	—		55	alcalina	»	negativa	»	»	
6 »	1890	—		70	»	tracce	»	»	assente	Pochi glo rossi e qualche cilindro nel sedim. urinario.
11 »	1915	—		98	»	assente	»	»	»	Benessere.

CONIGLIO SANO.

TAV. 4

Data	Peso corporeo gr.	Solfosalicilato di urotropina gr.	Solfosalicilato di urotropina pro Kgr.	ESAME URINE Quantità c.c.	ESAME URINE Reazione	ESAME URINE Albumina	ESAME URINE Reaz. Rimini	ESAME URINE Reaz. Kobert	ESAME URINE Reaz. acqua di Br.	Osservazioni
11 Agosto	1840	—	—	92	alcalina	assente	assente	assente	assente	
12 »	1900	—	—	88	»	»	»	»	»	
13 »	1970	9.84	5	88	»	»	»	»	»	
14 »	1840	—	—	42	»	presente	»	»	presente	Aumentata eccitabilita riflessa, ematuria, cilindruria Rifiuta parte del cibo.
15 »	1700	—	—	17	acida	»	positiva	»	»	Idem-diarrea
16 »	1680	—	—	22	»	»	»	»	»	Idem.
17 »	1680	—	—	12	»	»	assente	»	»	
18 »	1760	—	—	20	»	tracce	»	»	assente	Ha mangiato.
19 »	1860	—	—	24	alcalina	assente	»	»	»	
24 »	1885	—	—	108	»	»	»	»	»	Benessere.

LABORATOIRE DE THÉRAPEUTIQUE DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE DE CUREGHEM.

Contribution expérimentale au sujet des effets de l'arsenic sur la croissance et le développement des os

par

A. VAN DEN EECKHOUT,
Professeur

L'arsenic est une substance eubiotique, qui s'emploie couramment pour ses effets stimulants sur les phénomènes de la nutrition intime ; de plus, si l'on en croit les auteurs classiques, il aurait une action excitante tout à fait spécifique sur la croissance et la formation des os.

En effet, si nous parcourons les traités de thérapeutique nous y trouvons :

« Sous l'influence de faibles doses d'acide arsénieux, les herbivores » et particulièrement les chevaux acquièrent de la vigueur et de l'em- » bonpoint, leur appétit augmente, ils ont le pouls plus fort et les » muqueuses plus colorées ; les poils prennent un brillant remarquable, » la respiration est plus facile, plus légère. (1)

« Le chimiste KOPP pendant qu'il travaillait les composés arse- » nicaux, voyait son poids corporel augmenter de 10 Kilogr. dans » l'espace de deux mois. (2) »

« On remarque aussi que les enfants qui ont subi plusieurs cures » arsénicales pour des affections de la peau, deviennent les plus grands » et les plus robustes de la famille. (3) »

« L'arsenic à petites doses diminue les oxydations, favorise la » croissance et la formation des tissus, c'est-à-dire, qu'il fait prédomi- » ner les phénomènes d'assimilation sur les processus de désassimi- » lation. (4) »

« On a constaté aussi que les femelles qui reçoivent de l'acide

(1) KAUFMANN. Traité de thérapeutique vétérinaire, IVe éd., p. 537.
(2) MEYER und GOTTLIEB. Die experimentelle Pharmakologie als Grundlage der Arzneibehandlung. III Aufl. Bl. 393.
(3) IDE. Traité de thérapeutique, II éd., p. 277.
(4) MEYER und GOTTLIEB. Loc. cit., bl. 393.

» arsénieux à petites doses engendrent des produits plus forts, plus » vigoureux et dont les os sont plus durs. Comme l'arsenic s'élimine » en partie par le lait, il en résulte que les petits à la mamelle reçoivent » de l'arsenic avec le lait, et on les voit augmenter rapidement de » poids, acquérir des tissus fermes et des os très compacts. (1) »

« Si, à des animaux nouveau-nés, on administre des fractions » de milligramme d'arsenic, il s'établit une action manifestement » favorable aussi bien sur la croissance des os que sur les phénomènes » de croissance en général. (2) »

« Les os des animaux qui ont reçu de l'arsenic sont plus longs » et plus épais dans la région corticale ; comme sous l'effet du phos- » phore ; ils montrent, sous les épiphyses, une masse épaisse et com- » pacte. (3) »

« Enfin rappelons qu'on a réussi avec l'arsenic toutes les expé- » riences sur la croissance des os, telles qu'on les a faites avec le phos- » phore blanc. (4) »

Nous trouvons des citations analogues dans SCHMIEDEBERG, FROEHNER, MANQUAT, etc.

Cependant, si les effets stimulants de l'arsenic sur les phénomènes de la nutrition générale sont établis tant par l'expérimentation que par l'observation empirique chez l'homme et les animaux, il n'en est pas de même, à notre avis, de l'action spécifique que ce produit exercerait sur le développement et la longueur des os.

D'abord, nous ne croyons pas que, en clinique vétérinaire notamment, l'on soit parvenu, par l'administration de l'arsenic, à augmenter la taille des animaux. D'autre part, à lire les auteurs que nous venons de citer, on remarque bien vite que toute la théorie de l'action stimulante de l'arsenic sur les phénomènes de l'ossification repose uniquement sur les expériences déjà anciennes de GIES (5). Or, comme nous aurons l'occasion de le faire remarquer, ces expériences ne sont pas à l'abri des critiques.

GIES a illustré son travail de quelques gravures. Nous y trouvons notamment la représentation de deux fémurs de lapin que nous reproduisons ci dessous (6).

Le fémur supérieur appartient à un sujet normal, l'autre provient d'un lapin traité à l'arsenic. Celui-ci est beaucoup plus long que le premier et plus épais dans la partie diaphysaire ; il présente à l'extrémité inférieure, sous le cartilage de conjugaison, un amas osseux compact et épais que l'on n'observe pas dans l'os normal.

---

(1) KAUFMANN. Loc. cit., page 538.

(2) STOKVIS-ZEEHUYZEN. Voordrachten over geneesmiddelen, IIe deel, blad 593.

(3) MEYER und GOTTLIEB, loc. cit., bl. 393.

(4) IDE. Loc. cit. p. 277.

(5) Archiv. für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, Bd VIII, 1878.

(6) Ces fémurs sont représentés dans le traité de MEYER et GOTTLIEB. Loc. cit.

La modification structurale que l'on constate dans le fémur du lapin traité à l'arsenic, ressemble à celle qui s'observe couramment dans les os des sujets soumis à l'action du phosphore blanc.

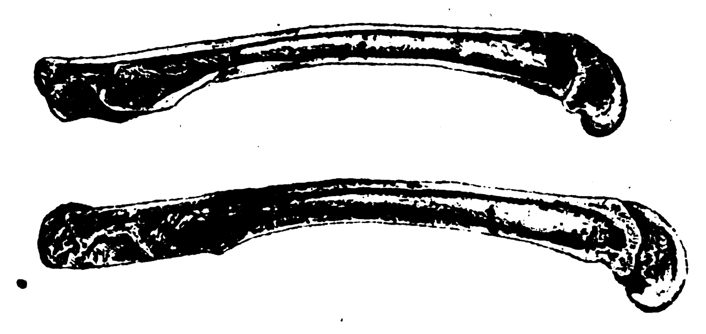


Figure 1.

Cette action stimulante sur les phénomènes intimes de l'ossification ne nous étonne guère, puisque nous savons que les effets pharmacodynamiques de l'arsenic se rapprochent beaucoup de ceux du phosphore; mais ce qui nous étonne au contraire, c'est de voir la grande différence existant entre la longueur des deux os. Pour la raison clinique, invoquée plus haut, nous nous demandons si celle-ci n'est pas uniquement un effet du hasard.

Ces considérations d'une part, et, d'autre part, la possibilité d'obtenir un produit capable d'agir efficacement sur le rachitisme, si fréquent chez les animaux domestiques, nous ont déterminé à contrôler les expériences de GIES et à refaire l'étude de l'arsenic.

Mais, avant d'exposer nos propres observations, résumons brièvement les expériences de GIES.

Celles-ci portaient sur des lapins, des cocqs et des porcelets.

Expériences sur les lapins.

GIES se procure un lot de jeunes lapins, tous en bon état de nutrition, sensiblement de même poids et parmi lesquels il y a, par hasard, six sujets appartenant à une même nichée. Aux uns il donne de l'arsenic, tandis qu'il conserve les autres comme sujets de contrôle.

Après 34 jours, il tue deux lapins provenant de la même mère : un témoin et un sujet d'expérience. Ce dernier a reçu pendant 17 jours un demi-milligramme d'arsenic ; puis, pendant 8 jours, un milligramme et enfin, pendant 8 jours, deux milligrammes. Il est beaucoup plus fort que son témoin, qui ne pèse que 1270 grammes, alors que lui-même accuse un poids de 1700 grammes. Son squelette aussi est plus développé : les os de la tête, les vertèbres et les os du bassin sont plus forts et plus compacts, les os longs sont plus grands, plus épais dans la diaphyse et leur canal médullaire est réduit. Ils présentent,

en outre, des amas de substance osseuse compacte accumulés surtout à la région sous-épiphysaire supérieure de l'humérus et du tibia et sous-épiphysaire inférieure du fémur.

GIES fait remarquer que toutes les modifications observées chez ce premier sujet sont caractéristiques du traitement arsénical ; qu'elles se produisent déjà après une administration de doses minimales d'arsenic et qu'elles existent même d'une façon constante, quoique moins prononcées (le dépôt sous-épiphysaire est moins marqué et la longueur des os n'est guère influencée), chez des animaux qui n'ont pas reçu d'arsenic, mais qui sont restés en contact avec les lapins médicamentés ; que, par contre, elles font toujours défaut chez les sujets qui ont été élevés à l'écart.

Il admet que par la cohabitation, les sujets témoins empruntent des doses infinitésimales d'arsenic à l'air expiré et aux produits d'évaporation cutanée des animaux médicamentés.

A l'examen microscopique des os, GIES constate que la couche osseuse sous-épiphysaire, qui se forme sous l'action de l'arsenic, est constituée par du tissu osseux bien conformé mais différant cependant du tissu normal par des travées plus larges et plus massives, par des alvéoles plus petites et plus étroites ; que les os des arsénicophages ont les ostéoplastes des couches périostiques plus petits et moins nombreux que les os normaux, qu'ils ont également les canaux de Havers plus petits et moins nombreux.

Afin de prouver l'influence de l'arsenic sur la croissance en longueur des os, il donne les dimensions de l'humérus, du fémur et du tibia enregistrées :

I chez le lapin qui a reçu de l'arsenic pendant 34 jours;

II chez un sujet de la même nichée qui n'a pas reçu d'arsenic, mais qui a cohabité avec le nº I.

III chez un autre lapin aussi de la même nichée mais qui a été tenu constamment à l'écart.

Voici ces dimensions :

	I	II	III
Humérus	6,8 centim.	6 centim.	6 centim.
Fémur	8,8 »	7,7 »	8 »
Tibia	9,2 »	8,4 »	8 »

Poursuivant ses recherches, GIES accouple, à trois reprises, une femelle avec un mâle préalablement traités à l'arsenic. Trois fois il obtient des jeunes mort-nés. Il attribue l'accident ou développement anormal des jeunes qui mesuraient 7 millimètres de plus que des nouveau-nés normaux.

Comme nous le remarquions au début de ce travail, ces expériences à notre avis, ne sont pas à l'abri des critiques. Chacun sait que chez les lapins, la taille varie beaucoup suivant la race et les conditions ambiantes (nourriture, température du local, jeunes nés en

hiver ou en été) et que, de plus, dans une même nichée, on observe souvent une différence très marquée entre le développement des divers sujets. L'écart énorme entre la longueur des os du sujet n° I et ceux du sujet n° III, et qui s'accuse par un excès de longueur de 12,5 p. c. en faveur du premier, nous paraît tenir bien plus du hasard que d'une action médicamenteuse. Ceci nous paraît d'autant plus admissible que nous constatons que le fémur du lapin n° II, qui a cohabité avec le sujet n° I, et qui, pour le reste, présente les modifications structurales dues à l'arsenic est plus court que celui du lapin n° III qui a été élevé à l'écart et qui ne montre pas les dites modifications.

A vrai dire, GIES rencontre cette objection puisqu'il écrit : « on » peut faire remarquer que deux animaux d'une même nichée ne sont » pas toujours également grands, pas plus que deux enfants jumeaux » et il ajoute que ses conclusions ne sont pas basées sur cette observation unique, mais qu'elles prennent appui sur plusieurs constatations similaires. A notre avis, il a tort de ne pas décrire ces observations et de ne pas fournir d'autres mensurations. D'autre part, il ne dit pas si ses animaux d'expérience sont de même sexe que les témoins respectifs ; or, dans une même nichée les mâles sont généralement plus grand que les femelles.

Nous ne parlerons pas de ses expériences sur les coqs et les porcelets. Dans ces dernières, il compare deux animaux nourris chez lui et dont un seul a reçu de l'arsenic avec un troisième élevé à la campagne, donc dans des conditions tout autres. Ce dernier était beaucoup moins développé.

Nous estimons que pour asseoir des conclusions fermes, il importe d'opérer sur des animaux d'une même nichée et sensiblement de même poids ; de comparer des mâles avec des mâles et des femelles avec des femelles, d'élever les sujets dans les mêmes conditions et le plus normalement possible, de ne retenir que les individus parfaitement sains et de multiplier les observations. C'est dans ce sens que nous avons poursuivi nos recherches.

Avant de décrire les expériences et les observations qui font l'objet de cette étude, nous résumerons brièvement, à titre documentaire les résultats obtenus dans une première série de recherches, instituées pour étudier l'influence de l'arsenic sur la longueur et le poids des os (1). Ces recherches ont porté sur 40 lapins, appartenant à 5 nichées.

---

(1) Ces recherches ont fait l'objet d'une communication préliminaire au « XVIIe Vlaamsch natuur en geneeskundig Congres », Gand, Septembre 1913. Pour les détails consultez : « Handelingen van het XVIIe Vlaamsch natuur en geneeskundig Congres ». Gent. Ad. Hoste, 1914.

Nous avons divisé les animaux de chaque nichée en deux lots de façon telle que chaque lot renfermât le même nombre de mâles et de femelles ; de plus les animaux réunis avaient sensiblement le même poids dans les deux lots. Aux uns nous avons donné de l'arsenic, les autres ont servi de témoins.

Les sujets d'expérience de la première nichée ont reçu 1 milligr. d'arsenic par jour pendant 30 jours ; ceux de la deuxième et de la troisième nichée, une goutte de liqueur de Fowler par jour pendant 40 jours ; ceux de la quatrième nichée, d'abord 1 goutte de liqueur de Fowler par jour pendant 32 jours ; puis, 2 gouttes par jour pendant 14 jours ; enfin, ceux de la cinquième nichée, 2 gouttes de liqueur de Fowler par jour pendant 52 jours.

Pour établir l'action de l'arsenic nous avons prélevé les fémurs que nous avons d'abord mesurés exactement, puis séchés, dégraissés et pesés.

Le tableau ci-dessous montre ces fémurs ; ceux des arsénicophages sont à gauche, ceux des témoins à droite. Chaque rangée représente les sujets d'une même nichée (1).

A l'examen de ce tableau, deux choses attirent spécialement l'attention : 1°) les fémurs des sujets témoins ont sensiblement la même longueur que ceux des animaux qui ont reçu de l'arsenic, de sorte qu'il serait bien difficile d'établir, par le simple examen de la photographie, si les os des arsénicophages sont à gauche ou bien à droite ; 2°) parmi les animaux d'une même nichée, il y a parfois une différence très notable dans la longueur de ces os. Cette différence est surtout marquée pour les sujets de la deuxième et de la cinquième nichée. Pour ce qui est de la 4e rangée, il importe de remarquer que les 8 fémurs qui occupent le centre proviennent d'animaux qui ont été tués 1 ½ mois avant les autres.

Il résulte de ceci, qu'on s'expose inévitablement à des erreurs si on limite ses observations à quelques individus. Dans une même nichée, un sujet qui a reçu de l'arsenic ne doit pas nécessairement devenir plus grand que tous les autres individus qui ont servi de témoins.

Mais, si au lieu d'opérer sur quelques individus seulement, on étend ses recherches sur un grand nombre de sujets, il se dégage alors de l'expérience des données très précises au sujet de l'action de l'arsenic sur les phénomènes de la nutrition et sur le processus d'ossification. Cette action est nettement établie par les constatations suivantes :

Au début de l'expérience, les 20 lapins témoins pesaient 19300 grammes et les 20 arsénicophages, 19495 grammes ; le jour de l'abatage, les premiers pesaient 35807 grammes et les autres, 38952 gram-

---

(1) La disposition par nichées n'est par faite dans l'ordre chronologique des expériences. Nous avons placé au-dessus les os de la nichée la plus nombreuse que nous appelons nichée n° I et ainsi de suite.

mes. Il y avait donc en faveur de ces derniers un excès de poids d'environ 7,8 p. c.

Les 40 fémurs des témoins mesuraient ensemble 334,89 centimètres, ceux des arsénicophages 339,27 centimètres, d'où un excès de longueur de 1,3 p. c. en faveur de ces derniers.

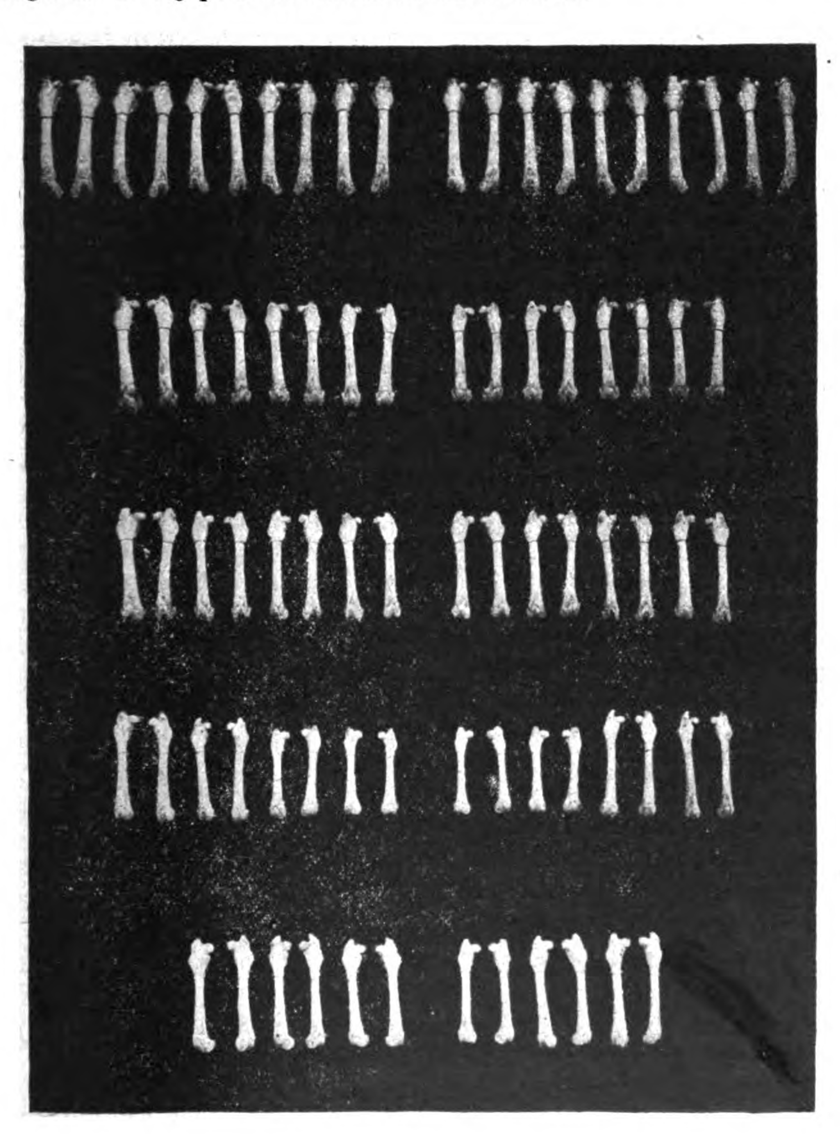


Figure 2.

Enfin, les 40 fémurs des témoins pesaient ensemble 162 grammes, les 40 autres 184 grammes, d'où un excès de poids de 13,6 p. c. en faveur des animaux traités par l'arsenic.

Il résulte donc de cette première série de recherches que, chez les lapins normaux, l'arsenic favorise les phénomènes de la nutrition générale ; qu'il favorise aussi les phénomènes d'ossification en ce sens qu'il rend les os plus lourds et plus denses (preuve faite pour les fémurs) mais qu'il n'influence que très peu leur croissance en longueur.

Expériences nouvelles.

Dans ces recherches, nous avons procédé comme suit : Nous avons élevé nous même nos lapins. Dans une nichée, nous avons d'abord séparé les mâles des femelles ; puis, dans chaque lot nous avons pris les sujets ayant sensiblement le même poids. Aux uns nous avons administré de l'arsenic, les autres étaient gardés comme sujets témoins, de sorte que tout lapin mâle ou femelle soumis à l'action de l'arsenic, avait son témoin mâle ou femelle, de la même nichée et sensiblement du même poids. Pendant toute la durée de l'expérience, les témoins étaient tenus rigoureusement éloignés des arsénicophages ; mais tous les animaux étaient élevés normalement et nourris avec de bons aliments par les soins de l'employé spécialement chargé à notre institut, de l'élevage des petits animaux.

Si au cours de l'expérience, un sujet devenait malade, ou s'il montrait des troubles pouvant influencer la croissance (inappétence de quelques jours), il était supprimé ainsi que son témoin, et vice-versa si c'était un sujet témoin qui devenait malade. Si, à l'autopsie un lapin montrait des anomalies dans l'un ou l'autre organe (cysticercose, coccidiose), il était également éliminé avec son témoin ou son arsénicophage correspondant.

Afin de ne pas troubler les fonctions digestives, nous nous sommes arrêtés à des doses légères d'arsenic. Celui-ci fut donné sous forme pilulaire.

En opérant ainsi, nous avons pu retenir 24 sujets appartenant à 5 nichées, dont 12 ont reçu de l'arsenic.

Afin de mieux suivre les effets du médicament, nous avons tué certains animaux pendant la période de croissance et d'autres à l'âge adulte.

Le contrôle a porté sur le poids des animaux ainsi que sur le poids, la longueur et la structure du fémur et du tibia. Les os furent mesurés immédiatement après l'abatage ; ils furent pesés après dessication et dégraissage par l'éther.

Dans l'exposé qui suit, les sujets d'expérience portent respectivement les numéros 2-4-6-8-10-12-14-16-18-20-22-24 ; les témoins ont les numéros impairs correspondants : 1-3-5, etc.

Les lapins d'expérience ont reçu :

Nº 2. Un milligr. d'arsenic par jour du 13 au 23 août ;
Nºs 4 et 6. Un milligr. d'arsenic par jour du 13 au 23 août et du 4 au 14 septemb.;
Nºs 8-10-12-14- et 16. Un milligr. d'arsenic par jour du 13 au 23 août, du 4 au 14 septembre et du 27 septembre au 7 octobre ;
Nºs 18-20-22 et 24. Un milligr. d'arsenic par jour du 10 au 20 avril et du 8 au 18 mai et deux milligr. d'arsenic par jour du 19 au 29 juin.

Les animaux furent tués :

Nºs 1 et 2. —	Le 4 septembre	à l'âge de	3½ mois.
Nºs 3 et 4. —	Le 18 septembre	à l'âge de	3 mois.
Nºs 5 et 6. —	Le 27 septembre	à l'âge de	3½ mois.
Nºs 7 et 8. —	Le 20 octobre	à l'âge de	4½ mois.
Nºs 9 et 10. —	Le 23 décembre	à l'âge de	6 mois.
Nºs 11 et 12. —	Le 23 décembre	à l'âge de	6½ mois.
Nºs 13 et 14. —	Le 30 mars	à l'âge de	9½ mois.
Nºs 15 et 16. —	Le 30 mars	à l'âge de	10 mois.
Nºs 17 et 18. —	Le 18 octobre	à l'âge de	10 mois.
Nºs 19 et 20. —	Le 11 novembre	à l'âge de	11½ mois.
Nºs 21 et 22. —	Le 11 novembre	à l'âge de	11½ mois.
Nºs 23 et 24. —	Le 16 décembre	à l'âge de	12½ mois.

Effets de l'arsenic sur le poids des animaux.

Au début de l'expérience les lapins pesaient :

Témoins :			Sujets d'expérience		
Nº	1	1350 grammes	Nº	2	1450 grammes.
»	3	900 »	»	4	900 »
»	5	1070 »	»	6	1050 »
	7	1300 »	»	8	1300 »
»	9	870 »	»	10	870 »
»	11	1050 »	»	12	1300 »
»	13	900 »	»	14	910 »
»	15	1350 »	»	16	950 »
»	17	860 »	»	18	860 »
»	19	1180 »	»	20	1020 »
»	21	1000 »	»	22	1080 »
»	23	1080 »	»	24	1030 »
Ensemble .		12910 »	Ensemble :		12720 »

Après l'abatage, ils pesaient (poids de la viande avec la tête, les membres coupés aux genoux et aux jarrets) :

Témoins :			Sujets d'expérience :		
Nº	1	1190 grammes	Nº	2	1300 grammes.
»	3	1250	»	4	1250 »
»	5	1590 »	»	6	1340 »
»	7	1700 »	»	8	1650 »
»	9	1560 »	»	10	1670 »

N° 11	1930 grammes	N° 12	2100 grammes
» 13	1870 »	» 14	1870 »
» 15	1670 »	» 16	1880 »
» 17	1370 »	» 18	1200 »
» 19	1620 »	» 20	1550 »
» 21	1420 »	» 22	1520 »
» 23	1650 »	» 24	1700 »
Ensemble :	18600 »	Ensemble :	19030 »

RÉSULTATS. — Au début de l'expérience, quatre sujets (2-12-14-22) étaient plus lourds que leurs témoins respectifs ; à l'autopsie, trois seulement (2-12 et 22) avaient conservé l'avantage du poids et le quatrième accusait le même chiffre que son témoin.

Quatre autre sujets (4-8-10-18), au début, avaient le même poids que les témoins ; à l'autopsie, deux seulement (4 et 10) accusaient un poids supérieur, les deux autres (8 et 18) avaient un poids inférieur.

Enfin, les quatre lapins restants (6-16-20 et 24), au début, étaient plus légers que les témoins ; à l'autopsie, deux lapins accusaient un poids supérieur (16 et 24), les deux autres un poids inférieur (1).

Mais, dans l'ensemble, les douze sujets d'expérience qui, au début pesaient 190 grammes de moins, à l'autopsie pesaient 430 grammes de plus que les douze témoins. Sous l'action de l'arsenic, il s'était donc établi en leur faveur un excès de poids d'environ 3 ½ à 4 p. c.

Chez les lapins parfaitement sains et bien nourris, l'arsenic n'a donc qu'une influence peu marquée sur le développement et le poids du corps ; il ne rend pas nécessairement le sujet traité plus grand et plus fort que tous les autres de la nichée ; il ne modifie pas profondément les facteurs individuels qui président au developpement du corps.

Effets de l'arsenic sur la longueur du fémur et du tibia.

La photographie ci-dessous représente les fémurs et les tibias des 24 lapins.

Chaque série comprend :

1° le fémur d'un sujet d'expérience ;
2° le fémur correspondant de son témoin ;
3° la moitié de l'autre fémur du sujet d'expérience ;
4° la moitié de l'autre fémur du témoin.

Puis les tibias dans le même ordre.

Les chiffres indiquent l'animal d'expérience.

(1) A remarquer l'énorme développement pris par le n° 16 qui, au début, pesait 400 grammes de moins que sur témoin ; mais que nous avons conservé à défaut d'autres sujets.

Par le simple examen de ce tableau, on remarque bien vite que les os des arsénicophages ne sont pas toujours les plus longs.

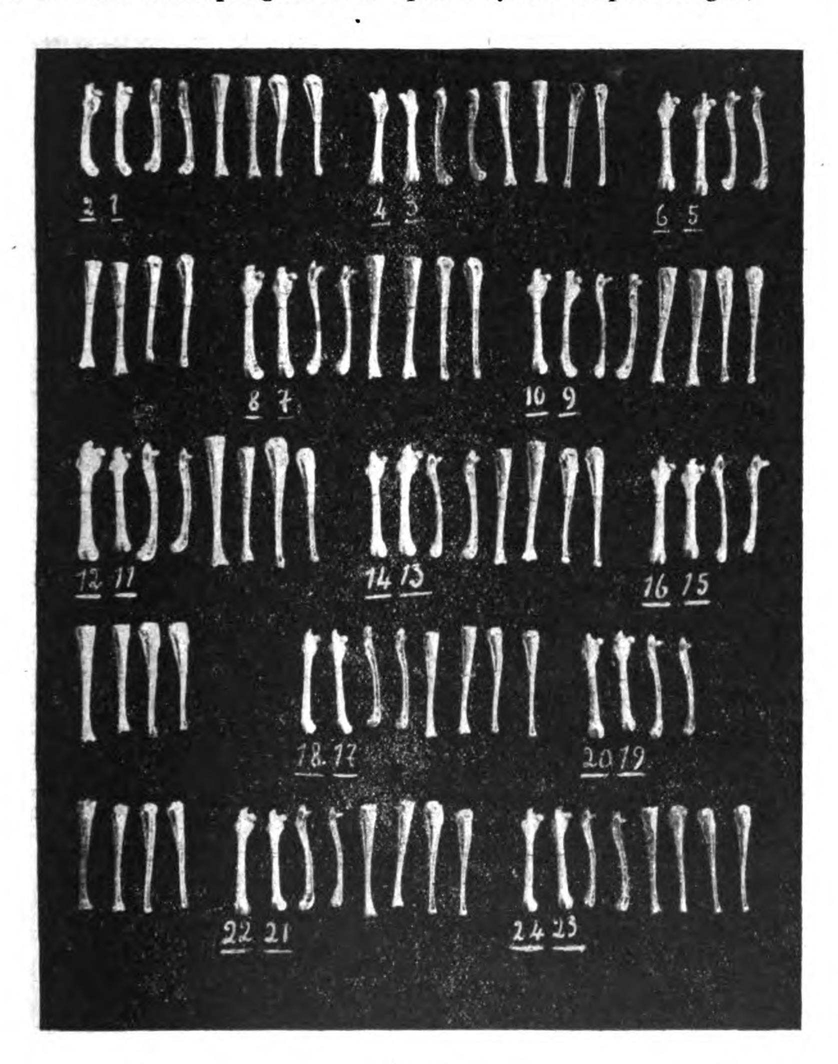


Figure 3.

Voici d'ailleurs, en centimètres, la longueur de ces os :

	Témoins :				Sujets d'expérience :		
	Fémurs.	Tibias.	Les deux os réunis.		Fémurs.	Tibias.	Les deux os réunis.
1	8,24	9,22	17,46	2	8,15	9,32	17,47
3	8,24	9,41	17,65	4	8,52	9,69	18,21
5	8,99	10,62	19,61	6	8,64	10,05	18,69
7	9,84	11,35	21,19	8	10,05	11,60	21,65
9	9,42	11,04	20,46	10	9,43	10,87	20,30

11	9,34	10,83	20,17	12	10,63	12,30	22,93
13	9,87	11,40	21,27	14	9,51	10,87	20,38
15	8,87	10,23	19,10	16	9,67	11,10	20,77
17	9,31	10,34	19,65	18	9,32	10,15	19,47
19	9,10	10,28	19,38	20	9,55	10,50	20,05
21	9,12	10,20	19,32	22	9,79	10,95	20,74
23	9,23	10,20	19,43	24	9,29	10,47	19,76
Ens.	109,57	125,12	234,69		112,55	127,87	240,42

RÉSULTATS : Trois témoins (1, 5 et 13) dépassent les sujets d'expérience par la longueur du fémur ; quatre (5-9-13 et 17), par la longueur du tibia et quatre (5-9-13-17), par la longueur des deux os réunis.

Les fémurs et les tibias additionnés ont, chez les témoins, une longueur totale de 234,69 centimètres et, chez les lapins soumis à l'action de l'arsenic, une longueur totale de 240,42 centimètres. Il y a donc un excès de longueur moyenne de 2,24 p. c. en faveur de ces derniers.

L'arsenic influence donc très peu la taille des sujets ; il ne rend pas nécessairement l'animal médicamenté plus grand que tous les autres de la nichée. Il n'y a pas de rapport constant entre le poids et la taille des sujets : les témoins 7 et 19 sont plus lourds, mais plus petits que les arsénicophages correspondants 8 e 20 ; le 13 a même poids que le 14, mais le dépasse par la taille ; enfin, le 9 est plus léger mais plus grand que le lapin nº 10.

Effets de l'arsenic sur le poids et la structure du fémur et du tibia.

Après dégraissage complet des os et dessication parfaite, nous avons enregistré les poids suivants, déterminés à un milligramme près.

	Témoins :			Sujets d'expérience :	
	Fémurs.	Tibias.		Fémurs.	Tibias.
1	4,190	3,780	2	4,314	4,110
3	3,975	3,580	4	4,333	3,010
5	4,860	4,530	6	4,020	4,408
7	6,935	6,047	8	7,050	6,300
9	5,830	5,450	10	6,070	5,845
11	5,671	5,428	12	7,960	7,340
13	6,290	5,872	14	5,725	5,275
15	5,150	4,650	16	6,280	5,905
17	4,470	4,121	18	4,020	4,741
19	5,049	4,770	20	5,203	4,981
21	4,752	4,482	22	5,672	5,007
23	4,786	4,329	24	5,031	4,710
Ensemble :	61,958	57,039		67,478	62,691

RÉSULTATS : A deux exceptions près, tous les os des lapins qui ont subi les effets de l'arsenic sont plus lourds que ceux des sujets témoins.

D'ailleurs, ces deux exceptions même ne sont qu'apparentes. Si le tibia du témoin n° 5 et le fémur et le tibia du témoin n° 13 accusent un poids supérieur aux os correspondants des sujets d'expérience n°s 6 et 14, cela résulte uniquement du fait que ces os sont beaucoup plus grands que ces derniers. Or, nous avons vu que la taille du sujet dépend de facteurs individuels peu influencés par le traitement arsénical. En réalité, ces os, tout en étant plus lourds que ceux des lapins arsénicophages, sont moins denses. On peut se rendre compte de ce fait en examinant plus loin la photographie des fémurs des sujets 13 et 14.

Nous observons donc ici une action bien manifeste et très constante de l'arsenic : ce produit rend les os plus denses et partant plus lourds, toutes choses égales d'ailleurs.

Dans nos expériences, l'exagération du poids des os chez les lapins traités est notable puisqu'elle est en moyenne de 9,33 p. c. En effet, les douze fémurs et tibias réunis pèsent chez les témoins 118,997 grammes et chez les arsénicophages 130,169 grammes.

On se rend bien compte de la différence dans la dureté du tissu osseux quand, au moyen d'une scie fine, on divise les os dans le sens de la longueur. Les os des arsénicophages offrent plus de résistance à l'instrument tranchant que ceux des animaux normaux. Ce fait a d'ailleurs été signalé par GIES.

D'autre part, comme GIES, nous avons observé que, sous l'action de l'arsenic, il se produit, aux extrémités de la diaphyse et surtout à la région sous-épiphysaire inférieure du fémur, une densification du tissu spongieux accompagnée souvent de la formation de couches de tissu osseux compact.

Dans nos expériences, ce dépôt osseux épiphysaire et sous-épiphysaire était surtout marqué chez les sujets, en période de croissance, entre 4 ½ et 10 mois. Il l'était beaucoup moins chez les animaux plus âgés. Chez ceux-ci l'exagération du poids résultait surtout d'une densification générale des os.

La densification du tissu spongieux, le dépôt d'amas osseux sous-épiphysaires et la densification générale des os ne s'observent que chez les animaux qui ont subi le traitement arsénical ; ils font toujours défaut chez les autres lapins quel que soit le développement des os. Ils se produisent donc sous l'action excitante spécifique de l'arsenic.

La photographie ci-dessous montre très clairement ce phénomène particulier d'ossification.

Le fémur du lapin n° 16 est plus long et plus lourd que celui du témoin n° 15 ; il présente, aux deux extrémités de la diaphyse, les couches osseuses spécifiques que nous venons de décrire. Par contre,

le fémur du lapin n° 14 est plus court et plus léger que celui du témoin n° 13 (c'est celui qui apparemment fait exception) ; mais, comme le fémur du n° 16 et comme les os de tous les animaux qui ont subi l'action de l'arsenic, il a une dureté plus grande que les os normaux et il présente les amas osseux spécifiques accumulés aux régions sous-épiphysaires. Le fémur du n° 13, quoique plus grand, ne présente pas tout cela.

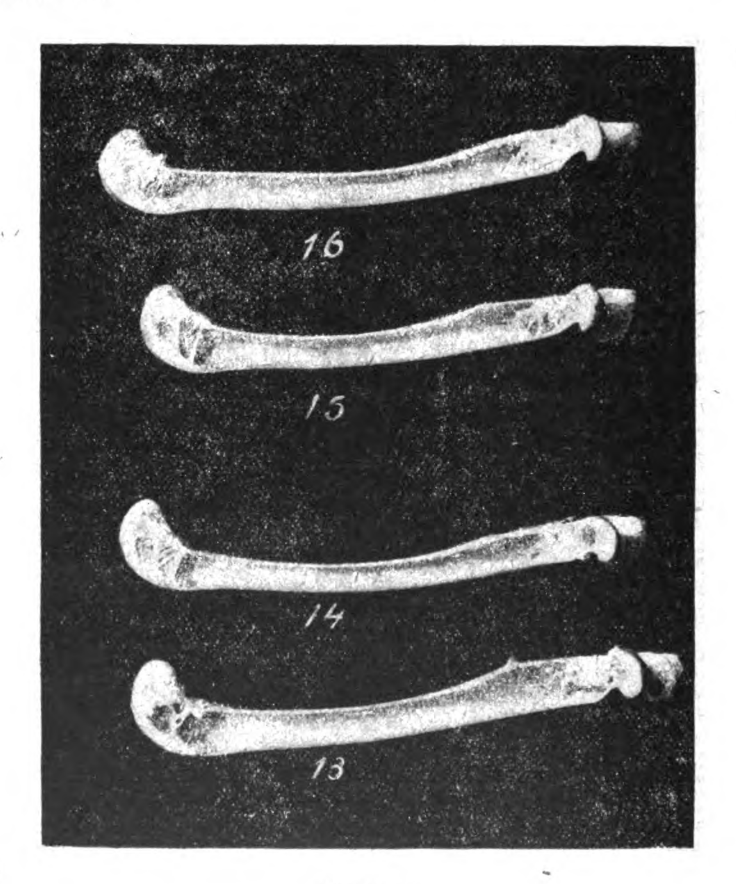


Figure 4.

Comme les os des lapins qui ont subi l'action de l'arsenic offrent une dureté plus grande que les os des sujets normaux, il est à présumer qu'ils présenteront aussi des modifications spécifiques dans leur structure intime.

Si, au microscope, on examine une coupe d'un de ces os, à première vue on ne constate rien de bien spécial : l'os arsénical a conservé le canevas général de l'os normal.

Mais, si l'on étudie comparativement la structure des os dans les deux séries, alors on observe une différence bien nette et très

constante dans la disposition des diverses parties constituantes.

Dans l'os arsénical, le nombre des systèmes de HAVERS a diminué, mais la lumière des canaux de HAVERS s'est rétrécie et chaque système haversien s'est accrue par suite de la formation exagérée de couches lamelleuses concentriques. D'autre part, le tissu interhaversien ou de préossification a diminué de sorte que, par endroits, les systèmes de HAVERS se touchent sans interposition de tissu fondamental. L'ensemble du système de structure présente un aspect plus compact que dans l'os du lapin normal. Les ostéoplastes aussi sont plus petits et généralement en diminution.

En somme, l'os arsénical est rendu plus lourd et plus résistant par suite d'une diminution de la porosité et d'une densification des tissus. Cet os paraît plus achevé.

Les dessins suivants, faits à la chambre claire, permettent de voir la plupart de ces particularités.

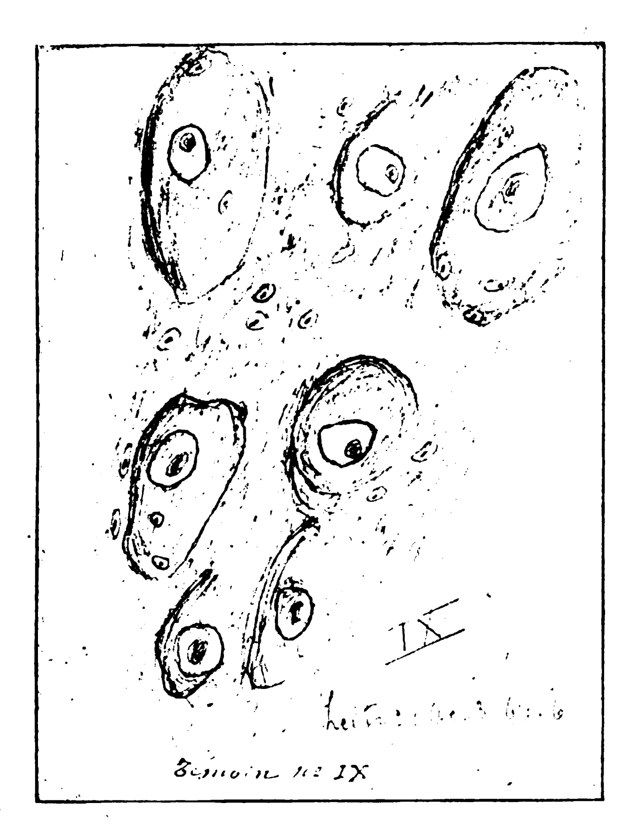


Figure 5. — Coupe d'un os normal.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS. — Au début de l'expérience, les douze sujets soumis au traitement arsénical pesaient ensemble 12720 gram-

mes ; les douze lapins témoins pesaient 12910 grammes. A l'autopsie, les premiers pèsent 19030 grammes et les autres 18600 grammes. Sous l'action de l'arsenic, il s'est donc établi une exagération de poids en faveur des premiers d'environ 3 ½ à 4 p. c. (Dans nos premières expériences l'excès de poids était d'environ 7,8 p. c.).

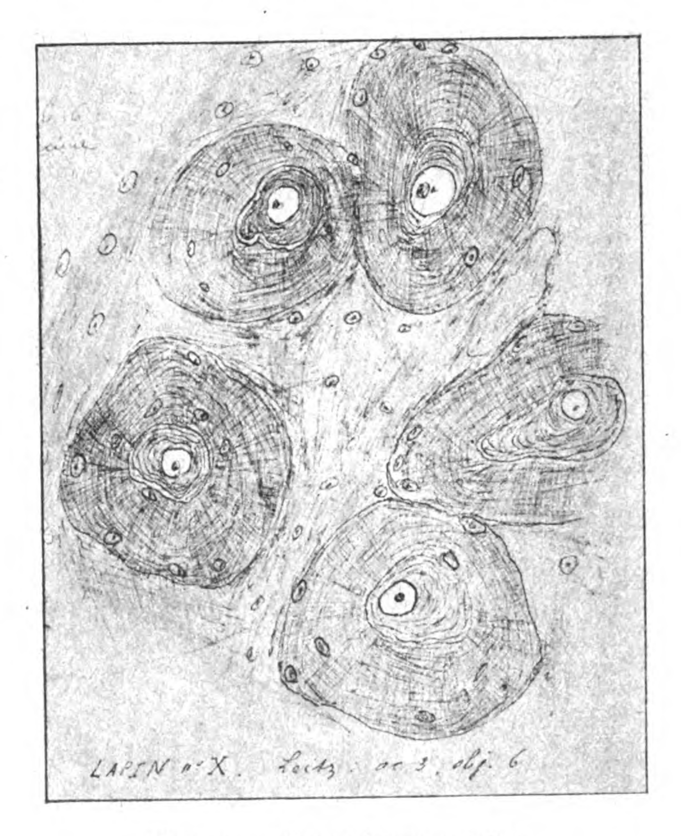


Figure 6. — Coupe d'un os arsénical.

Parmi les lapins médicamentés, huit sujets sont plus lourds que les témoins respectifs ; mais les quatre autres sont plus légers.

Les fémurs et les tibias des douze lapins traités mesurent ensemble 240,42 centimètres, tandis que ceux des douze témoins donnent 234,69 centimètres. Il y a donc, en moyenne, un excès de longueur en faveur des premiers d'environ 2,24 p. c. (Dans nos premières expériences l'excès de longueur était de 1,3 p. c.).

Parmi les sujets témoins, quatre lapins ont plus de longueur fémoro-tibiale que les animaux médicamentés correspondants : ils étaient donc plus grands que ceux-ci. Chez deux de ces lapins, le fémur et le tibia sont tous deux plus longs que chez les témoins ; chez les deux autres le tibia seul est plus long.

Un cinquième lapin témoin a le fémur plus long que l'arsénicophage correspondant.

Les fémurs et les tibia des douze lapins traités pèsent ensemble 130,169 grammes ; ceux des douze témoins s'élèvent à 118,997 grammes. Il y a donc, chez les premiers, un excès de poids moyen de 9,39 p. c. (Dans nos premières expériences l'excès de poids était de 13,6 p. c.).

A deux exceptions près, les os des lapins soumis à l'action de l'arsenic sont plus lourds que ceux des animaux normaux correspondants ; mais tous ces os, sans exception aucune, offrent une densité plus grande et montrent des modifications caractéristiques dans leur structure.

Tous ces os sont plus durs à sectionner ; ils présentent, surtout pendant la période de croissance entre 4 1/2 et 10 mois, des amas de tissu osseux compact aux extrémités des diaphyses et dans les noyaux épiphysaires.

Histologiquement ils se différencient des os des lapins normaux : dans l'os arsénical les systèmes de HAVERS sont moins nombreux ; mais chaque système haversien est devenu plus grand et plus résistant, par suite du rétrécissement du canal de HAVERS et de l'apposition de couches lamelleuses concentriques ; le tissu fondamental ou de préossification est en diminution de sorte que par endroits les systèmes haversiens se touchent ; les ostéoplastes sont moins nombreux et plus petits.

Comme conclusion de ce travail, nous admettons que, chez les lapins parfaitement sains et bien nourris, l'arsenic, administré à petites doses, influence très peu l'état d'embonpoint, le développement corporel et la taille des individus ; mais qu'il exerce une action manifeste et constante sur les phénomènes d'ossification, en ce sens qu'il modifie la structure intime des os de façon à les rendre plus denses, plus lourds et plus résistants.

LABORATOIRE DE L'INSTITUT DE BACTÉRIOLOGIE DE LOUVAIN.
DIRECTEUR : PROFESSEUR R. BRUYNOGHE.

LES BACTÉRIOPHAGES

par le

DOCTEUR J. MAISIN

INTRODUCTION. — Avant d'aborder l'étude détaillée de ce curieux phénomène, nous donnerons un aperçu historique de la question.

Le 19 septembre 1917, F. D'HÉRELLE fit connaître, dans les selles des convalescents de dysenterie, l'existence d'un principe capable d'opérer la dissolution des bacilles dysentériques. Il attribua ce pouvoir à un virus filtrant à travers bougie Chamberland, résistant à une température de 60° et parasite obligatoire des bacilles vivants dont il opère la lyse.

La présence de ce virus peut être mise en évidence de deux façons : soit par la lyse de cultures normalement développées de microbes subissant son action, soit par l'inhibition qu'il exerce sur le développement de ces germes sur des milieux fraîchement ensemencés.

1 / Si on prend en effet une culture en bouillon de bacilles de SHIGA âgée de 24 heures et qu'on y laisse tomber quelques gouttes de filtrat bactériophage, quelques heures après (de 12 à 24 heures) le milieu s'est complètement clarifié et est devenu aussi limpide qu'un tube non ensemencé. Une goutte du même filtrat qu'on laisse tomber sur un tube de gélose inclinée recouverte d'un enduit de B. de SHIGA, âgé de 24 heures, dissout sur son passage tous les microbes qu'elle rencontre et, après quelques heures d'étuve, la surface qu'elle a touchée est complètement nettoyée de germes et lisse comme de la gélose non ensemencée.

2 / Supposons enfin qu'à du bouillon on ajoute quelques gouttes de ce filtrat et qu'on ensemence d'une gouttelette de B. de SHIGA, ce tube ne présente aucun développement pendant plusieurs heures ou même pendant plusieurs jours (5 ou 6), alors qu'un bouillon témoin ensemencé en même temps donne un développement abondant.

Nous l'avons dit, D'HÉRELLE attribue ce pouvoir à un virus qui envahit les microorganismes et les lyse. Il soutient que c'est un germe

vivant en se basant sur les faits suivants : quand on filtre sur bougie Chamberland un bouillon qui a subi la lyse et qu'on laisse tomber une goutte de ce filtrat dans une autre culture en bouillon, la dissolution s'effectue à nouveau et ainsi de suite jusqu'à l'infini. Au contraire, si on place quelques gouttes du filtrat dans un tube de bouillon non ensemencé, qu'on prélève à nouveau quelques gouttes du mélange pour les reporter dans un deuxième tube et qu'on continue ces dilutions successives jusqu'à obtenir 6 ou 7 milieux, on voit que de ces divers tubes ensemencés dans la suite, les 3 ou 4 premiers seulement présentent une inhibition de développement. Les autres poussent normalement sans que le bactériophage y manifeste sa présence d'aucune façon. Donc par des dilutions simples en bouillon, le pouvoir bactériophage s'épuise rapidement ; si les dilutions se font en présence du tube ensemencé de microbes lysables, on peut aller de dilution en dilution jusqu'à l'infini. F. D'HÉRELLE dit que le virus bactériophage est un germe qui ne cultive pas en bouillon simple et dont le développement n'est possible qu'en symbiose avec des bacilles vivants qu'il peut parasiter. Il parvint à isoler des selles de malades des bactériophages actifs pour les B. de SHIGA, de FLEXNER et de HIS, pour les Bacilles typhiques et paratyphiques A et B, pour le Bacille enterides, le Bacille du hog-choléra, certains coli, le protéus, le Bacille sanguinarum, le Bacille pullorum et pour d'autres encore.

Ces divers bactériophages sont d'après lui des souches du même germe ayant acquis une virulence spéciale pour les divers microbes, virulence que l'on peut exalter.

Nous sommes donc en présence d'un phénomène tout nouveau, inconnu jusqu'ici en bactériologie.

Il faut noter pourtant que D'HÉRELLE n'a pas été le premier à découvrir le phénomène. TWORT (1) soumettant à l'analyse bactériologique de la vaccine, y a trouvé un principe apte à opérer en série la lyse de certains microbes.

TAMEZO KABESHIMA, dans une note publiée à la Société de biologie le 28 février 1920, mit en doute la nature organisée du principe bactériophage. Pour lui le bactériophage est un ferment. Normalement les corps microbiens renferment une prodiastase qui, sous l'influence d'un catalyseur fourni par les glandes du tube intestinal ou par les leucocytes, se transforme en diastase lytique pour les bacilles de nouvelle génération. Par la suite, la diastase ainsi formée joue le rôle de catalyseur et ainsi s'explique la transmission indéfinie du pouvoir lytique en présence de microbes vivants. Il appuie sa manière de voir sur diverses considérations que nous reprendrons plus loin.

Quelques mois plus tard, BORDET et CIUCA (2) obtinrent du bactériophage en injectant dans le péritoine d'un cobaye des cultures de

---

(1) TWORT. Lancet, 1915.

(2) BORDET et CIUCA : Comptes-rendus de la Société de biologie du 9 oct. 1920.

colibacilles de D'HÉRELLE. Ils inoculent, dans la cavité péritonéale d'un cobaye à 2 ou 3 jours d'intervalle et à 2 ou 3 reprises différentes, des cultures vivantes du coli de D'HÉRELLE de façon à provoquer un exsudat assez considérable. Deux ou 3 jours après la dernière injection, ils recueillent celui-ci dans 2 ou 3 fois son volume de bouillon, abandonnent à la température ordinaire pendant quelques heures, puis stérilisent par ½ heure de chauffage à 58°. Ils diluent encore une fois ce produit de 3 fois son volume de bouillon, ensemencent d'une goutte de colibacille de D'HÉRELLE et laissent le développement s'effectuer pendant 24 heures à l'étuve.

Ce développement est grêle. Les 24 heures écoulées, ils placent cette culture à la température ordinaire pendant 3 ou 4 jours au cours desquels elle a une tendance à se dissoudre, plutôt qu'à se développer davantage. Il suffit d'ajouter quelques gouttes de ce milieu, stérilisé par ½ heure de chauffage à 56°, à un tube de culture de bacilles de D'HÉRELLE normalement développés, pour en obtenir une dissolution rapide. Voilà donc la propriété bactériophage apparue sans l'intervention de substances ou de germes du tractus intestinal, sans que l'on puisse isoler du bactériophage des selles du cobaye en expérience, par simple contact des microbes, avec des humeurs organiques riches en leucocytes. BORDET et CIUCA attribuent ce pouvoir lytique à un ferment secrété par les microbes eux-mêmes. Voici comment ils expliquent ce phénomène et ses particularités : F. D'HÉRELLE avait montré déjà qu'un tube de culture, complètement lysé ou paraissant tel par addition de bactériophages, était rarement stérilisé, il se troublait à nouveau après un temps plus ou moins long variant de quelques heures à 4 ou 5 jours. Des microbes, résistants à l'action du bactériophage, se développent sans être inquiétés par celui-ci et resteront désormais réfractaires à son action. De plus le fait d'avoir été en contact avec du bactériophage et de leur avoir résisté, leur a conféré la popriété singulière d'en secréter et de transmettre héréditairement ce pouvoir à leurs descendants. Telle est l'opinion de BORDET et CIUCA. D'après eux, la modification première est imprimée au microbe par l'organisme, modification qui le rend apte à secréter une substance nuisible à son développement. Cette substance est diffusible dans les milieux liquides, elle va impressionner les germes réceptifs et les dissoudre ; ceux qui lui résistent subissent une transformation qui leur confert la propriété de secréter du bactériophage et ils transmettent cette viciation à leurs descendants et ainsi s'explique la transmission continuelle du pouvoir lytique.

De nombreux chercheurs se sont mis à la besogne depuis quelque temps et ont tâché de tirer au clair cette question. C'est ainsi que J. DUMAS (1) est parvenu à isoler des bactériophages des selles d'individus normaux, des selles du cobaye, de la terre et de l'eau. De même

(1) J. DUMAS : Comptes-rendus de la Société de biologie du 23 octobre 1920.

DERRÉ et HAGENEAU (1) isolèrent le principe de malades atteints d'affections diverses et étudièrent quelques-unes de ses propriétés. On ne peut passer sous silence l'opinion de SALIMBÉNI (2) qui croit que le bactériophage est une amoebe polymorphe qu'il parvient, dit-il, à mettre en évidence de diverses façons.

La question de la nature du bactériophage reste toute entière à résoudre. Les uns, D'HÉRELLE en tête, soutiennent que c'est un virus, les autres pensent que c'est un ferment. De plus, beaucoup de particularités du phénomène font encore le sujet de discussions. Dans ce travail nous étudierons les points du problème qui nous ont paru les plus intéressants, nous y exposerons les idées des divers chercheurs ainsi que les résultats de nos expériences personnelles.

CHAPITRE I.

Nous passerons d'abord en revue quelques particularités intéressantes du phénomène.

Nous avons dit déjà que D'HÉRELLE et d'autres étaient parvenus à isoler des bactériophages actifs pour diverses variétés microbiennes. Certains bactériophages sont actifs pour plusieurs souches et sans action sur d'autres. Néanmoins, D'HÉRELLE pense que l'on a affaire à des souches du même virus devenues virulentes pour des germes variés (3). Une des variétés la mieux influencée est certainement la variété de dysentérie SHIGA, qui se laisse lyser avec une facilité extraordinaire. Certains auteurs (4) soutiennent même que quelque soit l'origine des bactériophages qu'ils isolèrent quand ils étaient lytiques pour un microbe d'un autre groupe, ils l'étaient toujours pour le B. de SHIGA.

F. D'HÉRELLE a signalé le premier qu'un bactériophage inactif au début pour certains microbes, pouvait par adaptation acquérir un pouvoir lytique manifeste vis-à-vis de ceux-ci. BORDET et CIUCA ont signalé le même fait. Nous-même, nous avons pu vérifier l'exactitude de ces recherches.

Notre bactériophage au début était actif pour le colibacille de D'HÉRELLE et pour divers représentants de la variété SHIGA. Nous avons essayé son influence sur de nombreuses autres espèces qui n'étaient nullement influencées par lui, notamment divers staphylocoques, des streptocoques et des pneumocoques, de nombreux colibacilles

---

(1) DERRÉ et HAGENEAU : Comptes-rendus de la Société de biologie du 30 octobre 1920.

(2) SALIMBÉNI : Comptes-rendus de la Société de biologie du 6 novembre 1920 ; 11 décembre 1920.

(3) F. D'HÉRELLE : Comptes-rendus de la Société de biologie du 29 novembre 1919.

(4) DERRÉ et HAGUENAU : Comptes-rendus de la Société de biologie du 6 novembre 1920.

(15), 2 souches de typhus, 3 souches de paratyphus, le vibr. du choléra, le B. enteiides, le B. suipestifer, le B. fluoresceus, le B. pyocyanique et le B. proteus. Il était sans influence également sur une souche de dysenterie FLEXNER, exerçait une légère action (retard de 3 à 4 heures) sur le développement d'une souche de dysenterie Y, et sur une souche de dysenterie FLEXNER que nous appelons dysenterie III ; une autre souche de dysenterie FLEXNER, que nous appelons dysenterie IV, était retardée de 24 heures dans son développement.

Nous avons alors essayé d'obtenir par adaptation un bactériophage virulent pour chacune de ces 4 souches de dysenterie. Voici comment nous avons opéré.

Nous plaçons dans un tube de bouillon 10 gouttes de bactériophage et nous ensemençons d'une gouttelette de B. FLEXNER. Nous obtenons un développement normal comme dans un tube contrôle.

Après 24 heures nous prélevons une ampoule du tube ainsi développé et nous stérilisons par 1 heure de chauffage à 56°. A cette température, nous avons vu que le bactériophage résiste ; les microbes dysentériques sont tués. Nous portons une dizaine de gouttes de cette ampoule dans un second tube de bouillon, que nous ensemençons à nouveau d'une gouttelette de B. FLEXNER, qui donne à nouveau un développement normal. Après avoir répété quatre fois cette opération, nous avons constaté que notre dernier tube ensemencé présentait, après 36 heures d'étuve, une trace de dissolution. Après avoir poussé normalement comme le tube contrôle d'ensemencement, il s'était légèrement éclairci. Quelques gouttes de ce tube stérilisé par chauffage à 56° et portées dans un autre tube ensemencé de B. FLEXNER entrave, dès le début, le développement, sans toutefois l'inhiber totalement. Au 10e passage, nous avions obtenu un principe actif entravant complètement le développement de B. de FLEXNER pendant 18 heures. Les B. dysenterie III et Y, qui au début n'étaient empêchés dans leur développement que pendant 3 ou 4 heures, laissèrent entraver leur culture pendant 24 heures et plus par un bactériophage obtenu par la même technique.

Les tableaux ci-dessous résument les expériences au sujet du B. de FLEXNER.

1er passage			10e passage.		
10 gouttes de bactér. + B. de FLEXNER	10 gouttes de bactér. contrôle de stérilité	B. de FLEXNER contrôle d'ensem.	10 gouttes de bactér. adapté + B. de FLEXNER	10 gouttes de bactér. contrôle de stérilité	B. de FLEXNER contrôle d'ensem.
6h. +	—	+	6h. —	—	+
18h. ++	—	++	18h. —	—	++
24h. ++	—	++	24h. ⊥	—	++

Il est donc possible, par adaptation, de rendre virulent pour de nouvelles souches microbiennes, un bactériophage inactif au début sur ces souches.

Nous avons aussi essayé d'adapter le nôtre au bacille D'EBERTH (1). Nous n'y avons pas réussi.

Une autre particularité très curieuse du phénomène est la tendance du bactériophage à spécialiser son action sur les souches avec lesquelles il est maintenu en contact.

Notre principe bactériophage, au début, était actif pour le bacille de D'HÉRELLE et pour les bacilles de SHIGA. Dans la suite, nous avons pu obtenir un principe en quelque sorte spécifique pour chacun de ces microbes. Par une technique, que nous allons exposer, nous avons préparé un bactériophage très actif pour le bacille de D'HÉRELLE et sans action sur le bacille de SHIGA, et un autre bactériophage très lysant pour le bacille de SHIGA et sans influence sur le bacille de D'HÉRELLE. Nous obtenons les bactériophages électifs en ensemençant dans un tube de bouillon, additionné de quelques gouttes de bactériophage, une ou deux gouttes de B. de D'HÉRELLE; dans un autre tube de bouillon, additionné d'une certaine quantité de principe actif, nous déposons une à deux gouttes de B. de SHIGA. Après 24 heures, alors que les deux tubes sont encore parfaitement clairs et sans traces de développement, nous prélevons quelques gouttes de chacun d'eux et nous portons repectivement dans deux autres tubes de bouillon que nous ensemençons, le premier d'une goutte de B. de D'HÉRELLE, le second d'une goutte de B. de SHIGA. Nous avons répété cette manœuvre 5 ou 6 fois et à ce moment, nous avons pu observer l'activité élective que nous signalions plus haut. Nous consignons dans le tableau ci-dessous les résultats de cette expérience, que nous avons répétée plusieurs fois.

	Bactériophage de D'HÉRELLE spécialisé 5 gouttes.			Bactériophage de SHIGA spécialisé 5 gouttes		
	Ensem. HÉRELLE 2 gouttes	Ensem. SHIGA Br. 2 gouttes	Non ensem.	Encem. SHIGA Br. 2 gouttes	Ensem. HÉRELLE 2 gouttes	Non ensem.
6h.	—	++	—	—	+	—
24h.	—	++	—	—	++	—
48h.	—	++	—	—	++	—

(1) Mon maître, le Professeur BRUYNOGHE, a réussi cette adaptation dans la suite. Comptes-rendus de la Société de biologie du 15 juin 1921.

Nous faisons remarquer que les tubes de bouillon ensemencés de bacilles de SHIGA et de D'HÉRELLE, avaient abondamment poussé (++).

Il y a donc en quelque sorte une espèce de spécialisation dans l'activité du bactériophage. Ce fait est en contradiction avec les observations de D'HÉRELLE (1) et de DERRÉ et HAGENAU (2) et mérite d'être signalé. Ces auteurs, en effet, avaient affirmé qu'un bactériophage, actif au début sur deux souches, par exemple, conservait son activité sur les deux, même après de très nombreux repiquages en présence de l'une des deux variétés. Nous ne voulons pas prétendre que ce fait, que nous avons observé est général, mais toujours est-il qu'il démontre que dans certaines circonstances un bactériophage peut perdre la virulence dont il jouissait vis à-vis d'une expèce donnée tout autant qu'il peût l'exalter.

Nous faisons remarquer que le phénomène ne résultait pas de la production rapide de résistants dans le bactériophage inactif pour la culture avec laquelle nous ensemencions, car ces germes, qui se développaient ainsi rapidement dans un milieu renfermant du bactériophage désormais inactif pour eux, étaient influencés comme des microbes types, une fois qu'ils étaient portés dans leur bactériophage électif. Voulant pousser plus loin nos investigations à ce sujet, nous avons ensemencé sur gélose le microbe SHIGA Br. poussant ainsi sans retard dans du bouillon additionné de bactériophage D'HÉRELLE. De là, nous l'avons réensemencé sur milieu liquide. Etant donné que les microbes influencés par un bactériophage, qui lui sont devenus résistants, secrètent à leur tour du principe actif, si ces bacilles de SHIGA ont été influencés par le bactériophage D'HÉRELLE, ils doivent en secréter. Nous prélevons donc, après 24 heures d'ensemencement, une ampoule du bouillon ensemencé de bacilles de SHIGA, nous stérilisons 1 heure à 56°; nous en déposons 5 gouttes dans un tube de bouillon que nous ensemençons d'une gouttelette de B. de SHIGA, et 5 gouttes dans un autre tube de bouillon qui reste non ensemencé comme contrôle de stérilité. Nous constatons que le tube ensemencé pousse comme le tube témoin sans aucun retard, sans qu'une dissolution tardive s'y produise.

Sur les conseils de F. D'HÉRELLE lui-même, nous avons ensemencé le microbe SHIGA, additionné de bactériophage inactif pour lui, sur de la gélose inclinée pour étudier les caractères de son développement. D'après D'HÉRELLE, dans ces conditions, le développement se fait sur la gélose en laissant entre les colonies des espaces clairs, parfaitement circulaires, où le milieu reste nu et sans culture. D'après lui, chaque tâche représente l'endroit où pendant l'étalement s'est déposé sur la gélose un germe bactériophage. La grandeur de ces tâches va de l'étendue de la pointe d'une aiguille à un diamètre de 1 millimètre environ (3).

---

(1) F. D'HÉRELLE : note du 29 novembre 1919.

(2) DERRÉ et HAGUENAU : note du 6 november 1920.

(3) F. D'HÉRELLE : Comptes-rendus de la Société de biologie du 7 decembre 1919.

Notre gélose, après 24 heures, présentait un développement constitué d'une infinité de petites colonies serrées les unes contre les autres, sans cependant former un enduit uniforme comme celui, que présente un tube ensemencé avec un microbe SHIGA sans bactériophage. Après 48 heures, il n'y avait guère plus de différence entre les 2 tubes, si ce n'est que le premier était recouvert d'un enduit présentant de petites élevures sans être une couche plane comme celle couvrant le tube témoin.

Nous ne sommes pas à même d'affirmer si cette différence vraiment minime entre les deux développements provenait d'un reliquat d'action du bactériophage sur le développement du bacille de SHIGA ou non.

Comme conclusion de cette série d'expériences, nous croyons pouvoir déclarer que dans certains cas le bactériophage peut spécialiser son action pour certaines souches avec lesquelles on le maintient en contact et perdre son activité primitive pour d'autres variétés.

Nous avons examiné aussi si d'autres microbes encore influencés par chacun des deux bactériopgages, une fois devenus résistants à l'un d'eux, l'étaient aussi pour l'autre pour lequel ils n'étaient pas encore devenus résistants. Nous avons pu constater que ce résistant poussait également bien dans les deux souches du bactériophage spécialisé. Ce phénomène s'est montré très net pour une souche de bacille de SHIGA encore influencée par les deux bactériophages, ainsi que pour une souche FLEXNER que nous appelons dysenterie IV. Le tableau suivant montre comment nous avons opéré :

	Bacille SHIGA P. 2 gouttes.		Bacille dysenterie IV, 2 gouttes	
	Ensemencé sur bactérioph. HÉRELLE spécialisé	Ensemencé sur bactérioph. SHIGA spécialisé	Ensemencé sur bactérioph. HÉRELLE spécialisé	Ensemencé sur bactérioph. SHIGA spécialisé
6 heures	—	—	—	—
24 »	—	—	—	—
48 »	—	—	—	+
96 »	+	—		

Au moment où un résistant apparaît dans un tube, c'est-à dire 96 heures après l'ensemencement sur bactériophage D'HÉRELLE pour le B. SHIGA P, 48 heures après l'ensemencement sur le bactériophage SHIGA, pour le bacille dysenterie IV, nous prélevons ce résistant et l'ensemençons sur deux tubes de bouillon renfermant l'un du bactériophage D'HÉRELLE et l'autre du bactériophage SHIGA. Sur tous les deux, il pousse également bien après 6 heures et le développement se maintient tel les heures suivantes.

Il nous a paru intéressant de voir si le bactériophage fourni par le B. dysenterie IV, résistant au bactériophage D'HÉRELLE par exemple, était lui aussi, un bactériophage spécifique. Pour cela, nous avons éliminé le bactériophage D'HÉRELLE primitivement ajouté par 5 réensemencements successifs sur bouillon. Nous avons alors stérilisé une ampoule de ce bouillon par 1 heure de chauffage à 56°, porté 5 gouttes dans 4 tubes de bouillon que nous ensemençons le premier avec du B. de D'HÉRELLE, le second avec du B. de SHIGA, le 3e avec le B. dysenterie IV et le 4e restant comme contrôle de stérilité. Ci-dessous nos résultats :

	5 g. IV résist. à HÉRELLE ensemencé HÉRELLE	Idem ensemencé SHIGA Br.	Idem. ensemencé IV	Idem. stérilisé	Divers contrôles d'ensemencem.
12 heures	—	++	—	—	++
24 »	—	++	—	—	++
72 »	+	++	+	—	++

La spécificité s'est donc maintenue après un premier croisement, c'est-à-dire après un ensemencement par un autre bacille lysable.

Si on continue les croisements pendant 9 ou 10 passages, les résultats changent ; la spécificité disparaît, le bactériophage réacquiert son pouvoir lytique qu'il avait perdu pour l'autre souche, mais chose curieuse et toute entière à l'appui de la spécialisation de son action, en acquérant un pouvoir lytique élevé pour la troisième souche avec laquelle il a été maintenu en contact, il perd de sa virulence pour celle pour laquelle il avait spécialisé d'abord son action.

Nous avons pu constater ces faits lorsque nous avons adapté notre bactériophage pour les souches FLEXNER, Y, IV et III, dont nous avons parlé plus haut. Pour obtenir un principe actif sur FLEXNER, nous étions parti d'un bactériophage spécialisé pour le B. de D'HÉRELLE, pour les 3 autres nous avions utilisé un bactériophage spécifique pour le B. SHIGA Br. Après 10 passages, alors que nous avions obtenu un principe très actif pour les nouvelles souches, nous avons vérifié son action sur les B. de D'HÉRELLE et de SHIGA. Voici nos résultats pour le bactériophage adapté pour le B. dysenterie IV :

Bactér. IV ensem. B. dysenterie IV	Bactér. IV ensem. B. de D'HÉRELLE	Bactér. IV ensem. B. de SHIGA	Bactér. IV non ensem.	Contrôles d'ensem. des souches norm. B. dysenterie IV	B. de D'HÉRELLE	B. de SHIGA
12h. —	—	—	—	++	++	++
24h. —	+⊥	⊥	—	++	++	++
36h. —	+⊥	+	—	++	++	++
48h. +	+⊥	+	—	++	++	++

Nous rappelons que pour obtenir un bactériophage très actif pour IV, nous étions partis d'un bactériophage spécialisé pour SHIGA Br. Cette spécificité a disparu, puisqu'il exerce une inhibition de 12 heures sur le développement du B. de D'HÉRELLE, son action sur SHIGA a diminué d'intensité, il n'empêche nettement son développement que pendant 12 heures. Mais, d'autre part, en restant en contact continuel avec IV, il a acquis une virulence spéciale pour ce dernier, aux dépens, dirait-on, de ses propriétés primitives.

Les données fournies par les mêmes expériences exécutées avec les bactériophages adaptés à FLEXNER, dysenterie III et dysenterie Y sont venues confirmer ces résultats.

BORDET et CIUCA (1) ont montré que le pouvoir lytique ne se perpétue pas en présence de bacilles tués, comme c'est le cas pour les bacilles vivants, DERRÉ et HAGUENAU (2) ont constaté qu'une émulsion de bacilles vivants en eau physiologique n'était pas lysée non plus par le bactériophage.

Nous avons voulu vérifier ces faits en essayant l'action lysante du bactériophage sur des corps microbiens variés tués par différents moyens. Nous avons employé des bacilles de D'HÉRELLE, des B. de SHIGA, des B. typhiques et des staphylocoques tués par la chaleur (1 heure de chauffage à 56°), l'éther et le chloroforme. Dans un tube renfermant 1 centimètre cube de filtrat très actif, nous laissons tomber quelques gouttes de microbes tués de façon à obtenir une légère opalescence semblable à celle d'un tube témoin renfermant du bouillon additionné de microbes tués. La même opération est répétée pour chaque variété microbienne et pour chaque mode de stérilisation. Le tout est placé à l'étuve. Même après 2 ou 3 jours, nous n'avons pas observé de dissolution dans ces tubes. Un tube contrôle (cultures vivantes) renfermant la même quantité de bactériophage se dissout en une douzaine d'heures. Il va sans dire que nous avions fait les contrôles voulus pour nous assurer que nous opérions avec des germes morts.

Avant d'effectuer ces recherches, nous croyions que si la dissolution n'avait pas lieu, cela tenait simplement à une question de quantité de principe actif, les microbes morts ne secrétant pas de bactériophage ou éventuellement ne convenant pas à la culture du virus. Nous pensions que la minime quantité de bactériophage ajouté n'amenait la lyse que de quelques éléments, lyse inappréciable à la vue, c'est pourquoi nous en avons ajouté tout un centimètre cube dans nos essais, sans résultats d'ailleurs.

De plus nous avons examiné alors l'influence d'une culture de bactériophage en présence de microbes vivants sur des bacilles tués. A cet effet, nous ajoutons à deux tubes de bouillon une émulsion de B. de D'HÉRELLE tués, de façon à obtenir la même opalescence. L'un de

(1) BORDET et CIUCA : Comptes-rendus de la Soc. de Biologie du 9 oct. 1920.

(2) DERRÉ et HAGUENAU : Comptes-rendus de la Soc. de Biologie du 6 nov. 1920.

ces tubes est conservé comme tel à l'étuve, l'autre est additionné de quelques gouttes d'un bactériophage très actif et d'une goutte de culture de B. de D'HÉRELLE (bacilles vivants). Nous n'avons pas observé d'une façon bien nette une diminution d'opalescence du dernier tube sur celle du tube contrôle : la dissolution des microbes morts semble donc impossible par le bactériophage. Inutile de dire que dans cet essai, nous avons fait les contrôles voulus notamment celui de la stérilisation des microbes tués et celui de la détermination de l'activité du bactériophage utilisé dans l'essai en question.

F. D'HÉRELLE (1) a signalé aussi que jamais on n'obtient une clarification complète d'une émulsion concentrée de microbes vivants. Il explique ce fait en disant que les produits bacillaires entrés en solution exerçent une action empêchante sur la continuation de la réaction, comme cela se présente aux cours des opérations chimiques s'effectuant par l'intermédiaire des diastases. Il serait intéressant de vérifier si ce phénomène n'est pas dû, peut-être, au grand nombre de résistants qui apparaissent ainsi dans un tube fortement développé, résistants qui ne se laissent pas dissoudre. En effet, plus nombreux sont les germes soumis à l'action du bactériophage, plus de chance on a d'y rencontrer des éléments réfractaires à son influence, ou si vous voulez, vu la grande quantité de microbes, beaucoup échappent à la lyse, la culture de bactériophage ne parvenant pas à les dissoudre tous avant l'apparition et le développement de résistants, ce qui fait que le tube n'est jamais complètement éclairci.

CHAPITRE II.

Dans cette partie de notre travail, nous étudions la question des anticorps des bactériophages.

BORDET et CIUCA (2) ont montré qu'il était possible par vaccination d'obtenir un sérum antilytique.

Au moment de cette communication, des expériences semblables étaient en cours au laboratoire de Louvain.

Nous avons injecté à des lapins à 6 reprises différentes, du filtrat bactériophage actif. Nous avons commencé par 1 cc. de bactériolysat pour terminer par 3 cc. pour une injection ; nos injections étaient espacées de 4 jours.

Pour le lapin inoculé avec de l'autolysat du B. de D'HÉRELLE, nous n'avons pas observé de symptômes d'intoxication, pour celui injecté avec de l'autolysat du B. de SHIGA, il en fut autrement : après la 2e piqûre de 1 cc., notre animal maigrit et présenta de la paralysie

(1) F. D'HÉRELLE : Comptes-rendus de la Société de biologie du 24 janv. 1920.

(2) J. BORDET et CIUCA : Comptes-rendus de la Société de biologie du 29 janvier 1920.

des membres postérieurs ; ce qui nous força à interrompre l'immunisation pendant une dizaine de jours.

Dix jours après la dernière piqûre, nous avons saigné aseptiquement nos animaux et recueilli des sérums doués d'un pouvoir antilytique manifeste.

Nous avons vu dans le chapitre I de ce travail, que nous étions parvenus à obtenir des bactériophages spécialisés pour la souche de colibacille de D'HÉRELLE et pour la souche de bacille dysentérique SHIGA Br. Nous nous sommes demandé si les anticorps de ces bactériophages jouissaient de la même spécificité. C'est dans ce but que nous avons injecté à deux lapins différents d'une part du bactériolysat du coli de D'HÉRELLE, et d'autre part du bactériolysat du B. de SHIGA Br. obtenu avec un bactériophage spécialisé pour le B. de SHIGA Br.

Ces recherches nous ont prouvé que cette spécificité des anticorps n'existe pas; le serum antibactériophage SHIGA neutralise le bactériophage D'HÉRELLE et vice-versa.

Nous résumons dans le tableau ci-dessous les résultats de ces expériences :

NEUTRALISATION PAR LE SERUM ANTIBACTÉRIOPHAGE D'HÉRELLE.

	Bactériophage spécialisé pour le B. de D'HÉRELLE + sérum antibactériophage D'HÉRELLE.			Bactériophage spécialisé pour SHIGA + sérum antibactériophage D'HÉRELLE.		
	Ensemencé B. de D'HÉRELLE	Ensemencé B. de SHIGA	Contrôle de stérilité du mélange	Ensemencé B. de D'HÉRELLE	Ensemencé B. de SHIGA	Contrôle de stérilité du mélange
6h.	+	+	—	+	+	—
12h.	+ ⊥	+ ⊥	—	+ ⊥	+ ⊥	—
24h.	+ +	+ +	—	+ +	+ +	—

NEUTRALISATION PAR LE SERUM ANTIBACTÉRIOPHAGE SHIGA.

	Bactériophage spécialisé pour le B. de D'HÉRELLE + sérum antibactériophage SHIGA.			Bactériophage spécialisé pour SHIGA + sérum antibactériophage SHIGA.		
	Ensemencé B. de D'HÉRELLE	Ensemencé B. de SHIGA	Contrôle de stérilité du mélange	Ensemencé B. de D'HÉRELLE	Ensemencé B. de SHIGA	Contrôle de stérilisé du mélange
6h.	+	+	—	+	+	—
12h.	+ ⊥	+ ⊥	—	+ ⊥	+ ⊥	—
24h.	+ +	+ +	—	+ +	+ +	—

Nous avons fait les contrôles d'ensemencement des deux souches microbiennes ainsi que celui de la spécificité et de l'activité des deux bactériophages employés.

	Bactériophage spécialisé pour le B. de D'HÉRELLE 5 gouttes.			Bactériophage spécialisé pour le B. de SHIGA Br. 5 gouttes.			Contrôles d'ensemencement.	
	Ensem. B. de D'HÉRELLE	Ensem. B. de SHIGA Br.	Contrôle stérilisé	Ensem. B. de D'HÉRELLE	Ensem. B. de SHIGA Br.	Contrôle stérilisé	B. de D'HÉRELLE	B. de SHIGA Br.
6h.	—	+	—	±	—	—	+	+
12h.	—	++	—	+±	—	—	++	++
24h.	—	++	—	++	—	—	++	++
48h.	—	++	—	++	+	—	++	++

Au début de nos expériences, nous laissions l'immun-sérum en présence du bactériophage pendant 24 heures. Après ce laps de temps nous portions une goutte du mélange dans des tubes de bouillon que nous ensemencions. Nous avons vu par la suite que le contact prolongé n'était pas nécessaire, le mélange fait au moment même de l'ensemencement neutralise également bien le pouvoir lytique.

Nous avons déterminé aussi l'activité de nos sérums.

Nous nous demandions si à la limite de la neutralisation nous ne verrions pas apparaître une certaine spécificité de nos anticorps. Il n'en fut rien. Tous deux étaient actifs au $1/2$, c'est-à-dire que deux gouttes de bactériolysat actif étaient neutralisées par 1 goutte d'immunsérum, et à cette dilution chacun d'eux annulait le pouvoir lytique de l'un ou de l'autre de nos bactériophages spécialisés.

Désireux d'étudier les propriétés du sérum d'un animal vacciné avec des bacilles de D'HÉRELLE résistants et de SHIGA résistants, nous avons injecté des émulsions de ces microbes à des lapins.

Après plusieurs réensemencements de ces bacilles sur gélose de façon à éliminer le bactériophage primitivement ajouté pour les obtenir, nous avons fait une émulsion de la dernière culture dans 10 centimètres cubes d'eau physiologique, ajouté $1/2$ % d'acide phénique et stérilisé par 1 heure de chauffage à 56°. C'est cette émulsion que nous avons injectée à nos animaux.

Nous ne sommes pas parvenu à vacciner un animal contre le microbe de SHIGA résistant. Tous mouraient intoxiqués même après l'administration de 2/10 de cc. de culture par voie intraveineuse.

Le coli de D'HÉRELLE, étant moins toxique, nous a permis d'obtenir un sérum actif par 5 injections intraveineuses. Toutefois, après la première injection nous avons dû nous abstenir de le réinoculer pen-

dant 10 jours à cause de signes manifestes d'intoxication. Les piqûres suivantes ont été espacées de 4 jours.

Le sérum que nous avons recueilli aseptiquement par saignée le 10e jour après la dernière injection, était doué d'un pouvoir antilytique sensiblement aussi actif que celui obtenu par l'injection de bactériophage comme tel. Comme le sérum antibactériophage D'HÉRELLE, il n'était doué d'aucune spécificité dans la neutralisation des bactériophages ; il annulait également bien l'action du bactériophage SHIGA spécialisé que celle du bactériophage D'HÉRELLE spécialisé, ainsi que le montre les résultats consignés dans le tableau ci-dessous.

	Bactériophage D'HÉRELLE spécialisé + sérum anti-D'HÉRELLE résistant.			Bactériophage SHIGA spécialisé + sérum anti-D'HÉRELLE résistant.		
	Ensemencé B. de D'HÉRELLE	Ensemencé B. de SHIGA	Contrôle de stérilisé du mélange	Ensemencé B. de D'HÉRELLE	Ensemencé B. de SHIGA	Contrôle de stérilisé du mélange
6h.	+	+	—	+	+	—
12h.	++	++	—	++	++	—
24h.	++	++	—	++	++	—

Il va sans dire que nous avons fait les contrôles d'ensemencement des B. de D'HÉRELLE et de SHIGA, ainsi que celui de l'activité élective des deux bactériophages.

	Bactériophage spécialisé pour le B. de D'HÉRELLE 5 gouttes.			Bactériophage spécialisé pour le B. de SHIGA Br. 5 gouttes.			Contrôles d'ensemencement.	
	Ensem. B. de D'HÉRELLE	Ensem. B. de SHIGA Br.	Contrôle stérilisé	Ensem. B. de D'HÉRELLE	Ensem. B. de SHIGA Br.	Contrôle stérilisé	B. de D' HÉRELLE	B. de SHIGA Br.
6h.	—	+	—	+	—	—	+	+
12h.	—	++	—	++	—	—	++	++
24h.	—	++	—	++	—	—	++	++
48h.	—	++	—	++	+	—	++	++

On voit donc qu'il est possible d'obtenir des anticorps doués d'un pouvoir antilytique évident, soit par injection aux animaux de bactériolysat actif, soit même par l'injection de microbes devenus résistants à l'action du bactériophage.

On pourrait objecter que peut-être le sérum de lapin normal exerce une action neutralisante sur le bactériophage. Nous avons

refait les mêmes expériences que plus haut en mettant nos principes actifs en présence de 10 fois leur volume de sérum de lapin normal; toujours, après le contact, nos bactériophages avaient conservé une très grande activité.

Enfin, nous avons immunisé un lapin contre le B. de D'HÉRELLE normal. Il semble que le sérum de l'animal qui a subi des injections intraveineuses répétées (5) de ce microbe, exerce une certaine action sur le bactériophage, en ce sens que les microbes poussent plus abondemment sur du bouillon additionné de quelques gouttes du mélange bactériophage + sérum anti-D'HÉRELLE normal, que sur du bouillon auquel on ajoute le même nombre de gouttes du mélange bactériophage + sérum lapin normal. Nous ne voulons pas dire qu'il s'agit d'une neutralisation, car l'action du bactériophage de ce mélange est encore très évidente, alors que dans les tubes où le bactériophage a subi l'influence du sérum spécifique, l'activité inhibitive fait totalement défaut.

	Bactériophage D'HÉRELLE + sérum lapin normal.		Bactériophage D'HÉRELLE + sérum anti-D'HÉRELLE normal.	
	Ensemencé B. de D'HÉRELLE	Contrôle de stérilité du mélange	Ensemencé B. de D'HÉRELLE	Contrôle de stérilité du mélange
6h.	—	—	⊥	—
12h.	—	—	—	—
24h.	—	—	+	—
36h.	—	—	++	—
48h.	+	—	++	—

Contrôle d'ensemencement B. de D'HÉRELLE. (++)

Ces recherches confirment donc celles de BORDET et CIUCA et elles établissent en outre que, si dans certains cas le bactériophage peut devenir spécifique pour certaines variétés microbiennes, les anticorps ne jouissent nullement de cette spécificité.

CHAPITRE III.

La question de la résistance qu'acquièrent à un moment donné certains microbes, appartenant à une race lysable, est certainement un des points les plus curieux de la lyse microbienne transmissible. Aussi, dans ce chapitre nous examinerons en détails, les caractères nouveaux de ces germes. Nous y verrons également la distinction qu'il y a lieu de faire entre les diverses variétés de résistants et les renseignements précieux que peut donner l'étude de ces microorganismes au point de vue de la nature même du principe bactériophage.

Tout d'abord, qu'entend-on par microbe résistant?

Nous l'avons vu, c'est un germe appartenant à une variété de microbes influencés par le bactériophage, parvenant à résister à l'action destructive de celui-ci et à se développer malgré sa présence. En général, ils transportent avec eux, la propriété bactériophage, c'est-à dire que repiqués de multiples fois sur divers milieux de façon à éliminer le principe primitivement ajouté pour les obtenir, leur culture une fois stérilisée par 1 heure de chauffage à 56° possède toujours un pouvoir lytique évident.

BORDET et CIUCA disent que ce sont des microbes qui ont subi une modification par contact avec le principe actif, modification telle qu'elle leur confère la propriété d'en secréter.

F. D'HÉRELLE et les partisans de la théorie déclarent au contraire, que ce sont des microbes parasités, portant en eux le virus lytique tout en étant insensibles à son action.

Que ce soient des éléments modifiés secréteurs de ferment lytique ou des porteurs de virus, sont-ce des éléments immédiatements résistants, naturellement résistants, ou bien le deviennent-ils au contraire, par suite d'une lutte victorieuse contre l'agent destructeur?

En d'autres mots dans une culture normale existe-t-il quelques microorganismes déterminés naturellement insensibles, ou bien tous les germes d'une culture peuvent-ils le devenir?

Il est difficile de répondre à cette question. Nous pensons que ce phénomène rentre dans le cadre de l'immunité, et que tout germe cultivé en symbiose avec le bactériophage, peut par une espèce d'immunisation acquérir cette résistance.

Parmi les microbes résistants, il existerait des germes plus résistants les uns que les autres, GRATIA (1) a signalé ce fait. En effet, il arrive presque régulièrement qu'une première génération de résistants qui a poussé en présence de bactériophage se redissout presque totalement 24 heures après, pour être suivie d'une nouvelle poussée de germes qui parfois se redissout encore. Comme le dit GRATIA, on a l'impression d'une succession de vagues de croissance et de redissolution, chaque vague nouvelle correspondant à des individus plus résistants.

Cette constatation peut s'expliquer aussi par la disproportion qui peut exister à certain moment entre le nombre de germes et la quantité de bactériophage soit virus, soit ferment. Ce pourrait être aussi une question de virulence du bactériophage.

Maintenant que voilà exposées quelques généralités du phénomène, voyons les caractères de cette race nouvelle.

Nous étudierons à part les caractères des colibacilles résistants de D'HÉRELLE et ceux des diverses souches de dysenterie.

Quand on examine au microscope, une culture de coli de D'HÉ-

---

(1) GRATIA : Comptes-rendus de la Société de Biologie du 29 janvier 1920.

RELLE résistants, on remarque que beaucoup d'éléments prennent mal la matière colorante, c'est là un fait constant. Certains sont normaux. La plupart sont un peu plus grêles que les normaux avec une extremité légèrement effilée. Il existe de nombreuses formes très longues et grêles.

Cultivé en bouillon le genre de développement varie : parfois, le milieu est à peine trouble, et dans ce cas, les ondes caractéristiques du développement des coli en milieu liquide sont peu marquées ; parfois, au contraire le milieu est fortement opaque; après quelques jours, il se forme un anneau autour du tube à la surface du bouillon et il ne diffère d'une culture normale, que par l'absence de voile.

Si l'on prélève une goutte d'une culture en bouillon, et qu'on l'ensemence sur un tube de gélose inclinée, toute la surface parcourue par la goutte se recouvre généralement d'un enduit gras et muqueux; au fond du tube on peut obtenir un développement tellement gluant qu'il ressemble à un petit paquet de glaires.

Si l'ensemencement est moins massif, et que l'on parcourt la surface du milieu avec une anse chargée de microbes, on obtient un développement composé de colonies de formes irrégulières se touchant en certains points ou bien séparées les unes des autres par des espaces clairs dentelés.

Ces colonies sont opaques et grasses. Après quelques jours sur les espaces restés incultes, apparaissent de petites colonies circulaires, parfaitement rondes et beaucoup moins grasses.

Si les germes déposés sur la gélose sont moins nombreux encore et en nombre suffisamment petit que pour n'avoir que quelques colonies, on voit apparaître après 24 heures des colonies grasses, arrondies également ; le caractère muqueux s'accentue fortement les jours suivants. Sur les espaces clairs apparaîssent de petites colonies rondes semblables à celles signalées plus haut. Les caractères différentiels entre les deux variétés de colonies vont en augmentant les jours suivants, en sorte que 10 jours après l'ensemencement, en examinant macroscopiquement un tel tube on croirait avoir affaire à des colonies de germes totalement différents.

Examinés au microscope, leurs éléments sont sensiblement les mêmes ; leurs caractères semblables à ceux que nous avons décrits pour les microbes poussés en bouillon, peut-être les formes longues sont-elles plus nombreuses dans les colonies muqueuses.

Repiquées en milieu liquide, les petites colonies rondes ont une tendance à troubler uniformément le bouillon tandis que les colonies grasses, muqueuses, ont une tendance à pousser au fond du tube. Nous ne connaissons pas la cause de ces différences de développement et de caractères chez les microbes résistants provenant d'une même souche de B. de D'HÉRELLE normaux. Peut-être pourrait-on l'expliquer en disant que cette souche normale n'est pas composée d'éléments homogènes ? En effet, si l'on ensemence un tube de gélose inclinée avec le coli

de D'HÉRELLE de façon à avoir des colonies isolées, qu'on prélève 4 de ces colonies par exemple et qu'on les ensemence en bouillon, là déjà on voit de légères différences dans le développement : certains tubes deviennent rapidement troubles et se recouvrent d'un voile à la surface, d'autres restent plus clairs et ne donnent qu'un anneau. En présence de bactériophage, les colonies qui troublent moins fortement le bouillon donnent plus rapidement un résistant que les autres, on constate aussi de légères différences dans l'intensité de leur pouvoir fermentatif sur les sucres et de leur faculté de réduction du rouge neutre. On peut même en obtenir qui ne réduisent pas ce dernier. Toutes coagulent également bien le lait.

Les cultures sur d'autres milieux continuent à marquer une différence notable entre les B. résistants et les B. normaux et même entre les divers résistants.

Cultivées sur du lait, les colonies muqueuses, les colonies rondes et en général la plupart des résistants ne le coagulent pas. Une fois, nous avons obtenu une souche de résistants le coagulant. Ils ne réduisent pas le rouge neutre ou seulement exceptionnellement et dans ce cas la réduction est toujours tardive et incomplète. Tous fournissent moins d'indol que le microbe normal qui lui-même en fabrique peu. Sur pomme de terre il n'y a aucune différence, à noter, le développement est toujours gras et gluant.

Une certaine différence continue à se manifester entre la souche normale et la résistante dans le pouvoir fermentatif des sucres sur milieu tournesolé. Les résultats de ces expériences sont consignés dans le tableau ci-dessous.

FERMENTATION DES SUCRES.

	Glucose	Dextrose	Mannite	Maltose	Saccharose	Lactose
D'HÉRELLE normal.	+ +	+ +	+ +	+ +	—	+
D'HÉRELLE résistant.	+ +	+ +	+ +	+ +	+	+

Mais où la différence est manifeste, c'est quand l'on examine leur pouvoir fermentatif sur les mêmes sucres avec production de gaz. Nous avons employé pour cela des tubes de Einhorn, et suivi la fermentation pendant 4 jours. Dans le tableau suivant nous avons noté les diverses particularités, ainsi que la différence manifeste qui existe parmi les diverses colonies de résistants entre elles.

	Age de la culture	Glucose	Lactose	Maltose	Mannite	Saccharose
B. de D'HÉRELLE normal	12h.	+ +	+ +	+ +	+ +	—
	96h.	+ +	+ + +	+ +	+ + +	—
B. résistant, petites colonies rondes	24h.	—	—	—	—	—
	96h.	—	—	—	—	—
B. résistant, colonie muqueuse	24h.	—	—	—	—	—
	96h.	—	—	—	—	—
B. résistant, plusieurs colonies	12h.	—	—	—	—	—
	24h.	+	+	—	+	—
	48h.	+ +	+	+	+	—
	96h.	+ +	+	+ +	+ +	—

Les petites colonies rondes et les colonies muqueuses prises isolément ne fermentent donc aucun sucre avec production de gaz. Si on racle plusieurs colonies à la surface de la gélose et qu'on les ensemence, on constate une fermentation tardive des divers sucres, sauf du saccharose qui n'est d'ailleurs pas influencé non plus par le microbe normal.

F. D'HÉRELLE le premier a signalé qu'un résistant poussant sur bouillon, n'était pas agglutinable, alors qu'un tel microbe ensemencé sur gélose devenait agglutinable.

Qu'il provienne d'un milieu liquide ou solide, qu'il ait subi plusieurs repiquages ou non sur l'un ou l'autre de ces milieux, un B. de D'HÉRELLE résistant est toujours inagglutinable. Nous avons fait des essais d'agglutination avec des microbes provenant des colonies muqueuses ou des petites colonies rondes, avec des bacilles provenant d'un amas de colonies différentes, nous avons répété nos essais de nombreuses fois, jamais nous n'avons obtenu une souche agglutinable.

Nous notons ces résultats dans le tableau suivant :

SERUM ANTI-D'HÉRELLE NORMAL :

Doses de sérum	1/10	1/20	1/30	1/40	1/100	1/200	1/400	1/800	Contr. microbe seuls.
B. de D'HÉRELLE normaux	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+ + + +	+	—
B. résistant, plusieurs colonies.	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. résistant, colonies muqueuse	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B. résistant, petites colonies rondes	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Les bacilles normaux sont donc bien agglutinables, les résistants ne le sont pas du tout.

De plus, il semble que injectés à un animal aux mêmes doses qu'un bacille normal, ils sont moins aptes à amener la formation d'agglutinines. En effet, notre animal vacciné avec des B. résistants nous donna un sérum agglutinant pour les microbes normaux mais au 1/30 seulement, alors que ces derniers injectés aux mêmes doses donnent un sérum actif au 1/800.

Le sérum de lapin normal n'est agglutinant ni pour l'une ni pour l'autre souche, pas même au 1/5.

Il nous a paru intéressant de voir comment ces résistants se comportaient au point de vue de la déviation du complément.

Nous l'avons effectuée de la façon suivante. Nous ajoutons à une dose constante d'antigène, des dosesd écroissantes du sérum spécifique, inactivé par chauffage pendant une 1/2 heure à 56° et 1/20 de centimètre cube d'alexine. Après 1 heure de contact à l'étuve, nous y ajoutons le système hémolytique constitué de 1 cc. de globules dilués au 1/20 par du liquide physiologique et de 1 cc. d'une dilution d'hémolysine contenant environ 10 fois le titre de celle-ci. Nous avons utilisé comme antigène une émulsion dans l'eau physiologique de cultures sur gélose âgées de 24 heures. Cette émulsion est additionnée de 1/2 % d'acide phénique et chauffée à 56° pendant 1/2 heure afin d'en tuer les germes. La dose employée est telle que le double de celle-ci, non additionnée de sérum spécifique n'empêche plus l'hémolyse de se produire avec 1/20 de centimètre cube d'alexine.

Nous avons constaté que les microbes résistants de la souche de D'HÉRELLE ne déviaient pas l'alexine :

SERUM ANTI-D'HÉRELLE NORMAL.

Doses de sérum	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	Contrôles.	
B. de D'HÉRELLE normal	Pas d'Hémolyse	Pas d'Hémolyse	Pas d'Hémolyse	Pas d'Hémolyse	Hémolyse	Double dose de sérum + alexine + système hémolytique	Hémolyse
B. résistants	Hémolyse	Hémolyse	Hémolyse	Hémolyse	Hémolyse	Double dose de deux antigènes + alexine + système hémolyt.	Dissolution

Comme pour l'agglutination, les anticorps intervenant dans la déviation du complément sont fournis en quantité moins considérable par les microbes résistants que par les normaux.

On peut donc conclure de ces diverses expériences que la diffé-

rence est notable entre les colibacilles de D'HÉRELLE normal et celui devenu résistant à l'action du bactériophage.

Certaines différences existent aussi pour les diverses souches de dysenterie entre les individus normaux et ceux qui ne se laissent plus lyser, mais elles sont moins appréciables.

Pour la variété SHIGA Br. au microscope on note les mêmes particularités que pour le B. de D'HÉRELLE : assez bien de formes longues, des éléments plus grêles prenant par endroits moins bien la matière colorante.

Sur bouillon certains résistants poussent au fond du tube, d'autres troublent uniformément le bouillon mais moins intensément qu'une culture normale.

Sur gélose on note d'autres caractères suivant que l'on a affaire à l'une ou l'autre de ces deux variétés.

Celle poussant au fond du tube de bouillon, donne sur gélose un développement mince et sec à contours dentelés. Examiné par transparence; on remarque que cet enduit est composé de colonies déchiquetées, séparées les unes des autres par des espaces clairs couverts de très petites colonies rondes séparées les unes des autres.

L'autre variété donne un développement plus épais et plus gras à contours non déchiquetés ; on remarque que cet enduit a partout la même transparence que les colonies déchiquetées de la variété précédente ; il n'y a plus d'espaces clairs. Ces deux espèces de colonies ne présentent pourtant pas de différence dans leur culture ni dans leur pouvoir fermentatif des divers sucres.

Au point de vue agglutination, des différences notables existent. Les B. SHIGA résistants, poussant au fond du tube ne se laissent pas agglutiner, ceux troublant uniformément le bouillon sont au contraire très agglutinables.

Nous nous sommes servi comme sérum agglutinant du sérum anti-bactériophage SHIGA dont nous avons parlé au chapitre II. Cet immunsérum avait été obtenu comme on sait en injectant un bactériolysat de B. SHIGA Br. complètement limpide. Il ne renfermait donc que très peu d'antigène et cet antigène était à l'état dissout dans le bouillon; malgré cela le sérum obtenu était actif a 1/200.

Ci-dessous les résultats de ces agglutinations :

SÉRUM AGGLUTINANT ANTI-SHIGA BACTÉRIOPHAGE.

Doses de sérum	1/10	1/20	1/50	1/100	1/200	1/400	Contrôles microbes seuls.
B. SHIGA normal	++++	++++	++++	++	+	—	—
B. SHIGA résistant poussant au fond du tube	—	—	—	—	—	—	—
B. SHIGA résistant troublant uniformément le milieu	++++	++++	+++	+++	++	—	—

Nous avons refait ces essais avec le même résultat. Il y a donc au point de vue agglutination une différence nette entre la variété poussant au fond du tube et celle troublant uniformément le bouillon. Toutes deux semblent également résistantes à l'action du bactériophage, mais la variété poussant au fond du tube est la seule qui fournit du bactériophage, l'autre n'en fournit pas. Nous examinerons en détails ces différences au point de vue production de principe actif dans un paragraphe spécial de ce chapitre, tant pour le B. de SHIGA que pour celui de D'HÉRELLE.

Enfin, nous avons recherché les différences existant entre les B. dysenterie III. IV, FLEXNER, Y et leurs résistants.

En bouillon, les B. III et IV normaux donnent après quelques jours un voile à la surface et des grumeaux au fond du tube, leur résistant donne un développement très maigre troublant uniformément le milieu.

Les B. FLEXNER et Y normaux troublent uniformément et intensément le bouillon, leur résistant donne un développement très maigre avec un trouble uniforme.

Aucune de ces souches normales ou résistantes ne fournit de l'indol. Il existe quelques légères différences au point de vue fermentation des sucres en milieu sucré tournesolé, notamment pour les B. dysenterie III et IV dont les résistants ont perdu leur pouvoir fermentatif vis-à-vis du maltose.

Nous avons alors examiné l'agglutination de ces diverses souches sans remarquer de distinction entre les résistants secrétant du bactériophage ou non. Tous étaient aussi agglutinables que les normaux correspondants et souvent plus agglutinables. Nous nous sommes servi comme sérum agglutinant d'un sérum anti-FLEXNER du commerce.

Les microbes résistants en général, sont donc des germes pouvant être profondément modifiés au point de vue de leurs propriétés. Parmi

les résistants eux-mêmes, il y a lieu de faire des distinctions. Certains secrètent du bactériophage, ou si vous voulez, sont des porteurs de virus bactériophage, vivant en symbiose avec eux sans être digérés, d'autres sont devenus totalement réfractaires sans pour cela transporter avec eux le pouvoir lytique.

Nous avons mis ces faits nettement en évidence pour les B. de D'HÉRELLE, de SHIGA et dysenterie III.

Voici comment nous opérons :

Nous mettons dans 3 tubes de bouillon, quelques gouttes de bactériophage spécifique pour les B. de D'HÉRELLE, SHIGA et dysenterie III et nous ensemençons chacun de ces tubes respectivement avec chacun des trois germes ci-dessus. Le développement présente une inhibition de 48 heures en moyenne, alors il pousse un résistant. Nous prouvons que ces microbes sont des résistants authentiques en les ensemençant sur bouillon en présence de leur bactériophage spécifique : ils poussent aussi vite que ceux qui se développent dans des tubes contrôles ne renfermant pas de bactériophage.

Nous ensemençons chacun de ces résistants sur gélose avec une anse peu chargée de germes, de façon à obtenir des colonies isolées, bien espacées les unes des autres. Nous prélevons plusieurs de ces colonies et les ensemençons isolément sur bouillon. Ce dernier une fois développé, nous en prélevons une ampoule que nous stérilisons par 1 heure de chauffage à 56°. Nous en portons quelques gouttes dans un tube de bouillon pour voir s'il exerce une action inhibitive sur le développement des germes correspondants.

Pour le B. de SHIGA, nous avons prélevé ainsi 10 colonies différentes ; une seule de ces colonies renfermait du bactériophage et un bactériophage très actif, aucune des autres n'en renfermait. Celle véhiculant avec elle le principe lytique pousse au fond du tube, le bouillon supérieur restant parfaitement clair ; les autres donnent un trouble uniforme. Les autres caractères de ces cultures ont été étudiés plus haut.

Les tableaux ci-dessous montrent bien la présence de la propriété bactériophage chez l'une de ces colonies et son absence chez les autres.

SHIGA résistant colonie 2 Ensemencé SHIGA		SHIGA résistant colonie 2 contrôle de stérilisé	SHIGA normal-contrôle ensemencement.
6 h.	—	—	+
24 h.	—	—	+ +
48. h.	—.	—	+ +

SHIGA résistant colonie (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10) Ensemencé SHIGA		SHIGA résistant colonie (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ou 10) Contrôle stérilité	SHIGA normal-contrôle ensemencement.
6 h.	+	—	+
24 h.	+ +	—	+ +
48 h.	+ +	—	+ +

Nous nous sommes demandé alors si chacun des germes composant cette colonie 2 fournissant du bactériophage dans sa totalité était constituée exclusivement de germes qui avaient acquis définitivement la propriété d'en fabriquer ou bien d'un assemblage de germes producteurs et d'autres qui n'en fournissaient pas. Pour cela, nous avons à nouveau ensemencé le SHIGA résistant, colonie 2, que nous appellerons désormais SHIGA résistant 2, sur gélose de façon à obtenir des colonies isolées. Nous avons prélevé 6 de ces colonies. Aucune ne renfermait du bactériophage. Pourtant le tube raclé dans sa totalité et ensemencé sur bouillon, nous donne un milieu doué d'un pouvoir lytique énergique. Il n'y a donc là que quelques germes qui transportent en eux le principe bactériophage. Dès le premier réensemencement sur gélose, la majorité ne possède pas ce pouvoir.

Vu les affirmations de F. D'HÉRELLE au sujet des espaces clairs se présentant sur les cultures de gélose, à savoir que ces espaces clairs sont autant de colonies de germes bactériophages, nous nous sommes dit que peut être en raclant les espaces vierges de colonies aux environs de celles-ci et en les ensemençant en même temps que ces dernières, on obtiendrait de la sorte des milieux renfermant du bactériophage ; mais il n'en fut rien. Ces expériences répétées plusieurs fois ne nous donnèrent aucun résultat.

On pourrait se demander, si ces microbes résistants ne renfermant pas du bactériophage, ne pourraient pas en les remettant en contact avec celui ci acquérir la propriété d'en secréter ou de se laisser parasiter par le virus. Nous avons fait cet essai à 6 reprises avec 4 colonies différentes. Nous les mettons 48 heures en contact avec un bactériophage très actif; puis par 5 réensemencements successifs en bouillon, nous éliminons le principe lytique ajouté. Après cela, nous cherchons par la méthode habituelle si le dernier bouillon de culture renferme du bactériophage. Il n'en renferme pas. Donc, un microbe résistant ne secrétant pas du bactériophage, ne recupère plus sa propriété dans la suite, aussi longtemps du moins qu'il ne soit pas devenu normal.

Nous avons refait pour le B. de D'HÉRELLE la même série d'expériences. Pour ce dernier, nous avons isolé jusque 36 colonies différentes, provenant de résistants divers sans parvenir à en trouver une seule portant dans ses éléments le pouvoir lytique. Et pourtant le tube pris dans sa totalité contenait du bactériophage. Nous avons isolé au cours de ces recherches, des colonies muqueuses, des colonies rondes, les deux à la fois, chacune d'elles et des produits de grattage des espaces clairs les entourant, jamais nous n'en avons rencontré une secrétant du bactériophage. Ces mêmes insuccès se sont répétés au cours de nos recherches avec le bacille dysenterie III résistant.

On peut donc affirmer que la grosse majorité des microbes résistants ne renferme pas de bactériophage. De plus le pouvoir lysogène que certains transportent avec eux n'est pas un caractère héréditaire définitivement acquis, puisque la généralité des colonies filles qui en

proviennent ne possède plus cette propriété. Ces constatations nous semblent pouvoir rentrer dans la domaine de l'immunité. Aussi pour donner à ces deux variétés de résistants des noms couramment employés dans cette science, nous avons appelé ceux de ces bacilles doués du pouvoir lytique des immunisés porteurs de germes et ceux qui en sont dépourvus des immunisés indemnes de virus (1).

Enfin, une question importante est celle de la guérison de ces divers résistants au bactériophage, c'est-à dire, la perte de leur immunité au cours de leur reproduction. Cette particularité du phénomène a été bien étudiée par BRUYNOGHE (2).

A priori, il est logique d'admettre que telle guérison puisse se faire comme cela se présente d'ailleurs chez l'homme au cours d'affections contagieuses : une immunité acquise pouvant se transmettre à une première génération et se perdre dans la suite. Cela étant, le caractère de résistance au germe lytique se perdra d'autant plus facilement, qu'il sera moins solidement acquis ; un résistant non porteur de germes solidement immunisé guérira plus difficilement qu'un résistant jeune, encore parasité. Ce sont les conclusions qu'il nous semble permis de tirer des recherches de BRUYNOGHE. Voici en effet ce qu'il a pu démontrer.

Certaines colonies de microbes de D'HÉRELLE devenus résistants au principe bactériophage, pourvu qu'ils soient récents, sont composées de germes qui se comportent d'emblée ou après quelques repiquages comme la souche de D'HÉRELLE normale. Même après 6 repiquages de B. de SHIGA résistants en milieu liquide renfermant à parties égales du bouillon et du sérum antilytique SHIGA, il ne parvient pas à isoler des éléments guéris. Pourtant le sérum antilytique employé était parfaitement actif puisqu'il parvenait à guérir des cultures de B. de D'HÉRELLE résistants. Dans la suite, même en ensemençant sur gélose il n'est jamais parvenu à obtenir des guérisons parmis les B. de SHIGA résistants.

La guérison des B. de D'HÉRELLE résistants s'obtient assez aisément en suivant la technique de BORDET et CIUCA (3), notamment en ensemencant de ces résistants sur gélose inclinée recouverte de sérum antilytique. D'ailleurs pour ces germes, on peut obtenir les mêmes résultats en les repiquant sur bouillon additionné de sérum spécifique. Ces cultures redeviennent d'autant plus rapidement normales, c'est-à-dire lysables, qu'elles sont plus récentes (développées depuis moins longtemps dans le milieu renfermant du bactériophage). Ainsi deux ou trois passages sur gélose suffisent ordinairement pour obtenir la guérison de ces derniers, tandis que les résistants anciens

---

(1) R. BRUYNOGHE et J. MAISIN : Compte-rendus de la Société de biologie du 30 avril 1921.

(2) R. BRUYNOGHE : Compte-rendus de la Société de biologie du 28 mai 1920.

(3) BORDET et CIUCA : Comptes-rendus de la Société de biologie de mars 1920.

exigent un beaucoup plus grand nombre de repiquages sur gélose recouverte de sérum spécifique pour obtenir le même résultat. De plus les éléments résistants récents perdent leur immunité par simple passage sur gélose recouverte de sérum de lapin normal, la seule différence c'est que le nombre des réensemencements doit être plus nombreux. Avec du sérum humain frais ou inactivé, il n'a pu obtenir aucune guérison.

On voit donc que la guérison s'obtient d'autant plus aisément que le résistant est plus jeune, c'est-à-dire a subi moins longtemps l'action du bactériophage : ce sont ces cultures renfermant de nombreux porteurs de germes. Celles-ci montrent leur moindre résistance à l'agent lytique puisque spontanément elles perdent après peu de passages leurs moyens de défense contre lui.

Les B. de SHIGA ne se laissent pas guérir ou guérissent plus difficilement. En suivant le même ordre d'idées, on pourrait dire que cela provient de ce que généralement la variété SHIGA est fortement influencée par le bactériophage, les individus qui résistent après une longue lutte victorieuse sont fortement réfractaires et ne perdent que difficilement ou après un temps beaucoup plus long leur nouvelle qualité acquise. Ainsi, pour le B. de D'HÉRELLE, les résistants anciens, ceux qui ont subi pendant longtemps le contact du bactériophage et sont sortis victorieux de la lutte, ceux qui ne sont plus des porteurs de germes, ceux-là aussi gardent plus longtemps ces propriétés résultant de leur combat prolongé.

Comme l'a fait remarquer BRUYNOGHE (1) cette disparition à la longue du pouvoir de résistance des bactéries a une importance dans l'assainissement des milieux extérieurs par le bactériophage, le champ d'action de celui-ci devenant de ce fait beaucoup plus étendu. Notons en passant que le bactériophage existe dans ces milieux ainsi qu'à pu le prouver J. DUMAS (2).

CHAPITRE IV.

De nombreuses discussions ont été engagées quant à la nature du principe bactériophage, la question aujourd'hui est loin d'être définitivement tranchée.

D'HÉRELLE, nous l'avons vu dans l'introduction de ce travail, prétend avoir affaire à un virus. Il base son opinion sur les faits suivants (3) :

La lyse microbienne est transmissible à l'infini pourvu qu'elle se fasse en présence de microbes vivants. Au bout d'un certain nombre

(1) R. BRUYNOGHE : Compte-rendus de la Société de biologie du 31 mai 1921.

(2) J. DUMAS : Compte-rendus de la Société de biologie du 23 octobre 1920.

(3) F. D'HÉRELLE : Compte-rendus de la Société de biologie du 24 janvier et 6 mars 1920.

de réensemencements la dilution du principe primitivement ajouté tend vers l'infini et pour que son action continue à la manifester il faut admettre qu'il se multiplie. Cette multiplication dit D'HÉRELLE, est réelle, la quantité de principe actif augmente après chaque lyse, ce qui cadre bien avec l'idée d'un être vivant et pas avec celle d'une diastase. Nous avons déjà dit que pour D'HÉRELLE les tâches claires sur gélose que l'on constate en y ensemençant un microbe lysable en présence de principe actif, représentent autant de colonies de virus bactériophage. Ces tâches doivent donc augmenter avec le nombre des germes et c'est ce qu'il constate, dit-il.

Si l'on ajoute beaucoup ou peu d'un bactériophage virulent, le résultat est toujours le même, c'est la lyse du milieu de culture ainsi ensemencé, il n'y a qu'une différence de temps. Quand on ajoute peu de germes, dit D'HÉRELLE, quelques microbes seulement sont parasités, le virus s'y multiple et opère leur dissolution, dissolution qui libère une nouvelle génération de germes lytiques beaucoup plus nombreux qui à leur tour iront se multiplier dans de nouveaux microbes encore intacts. Il y a de la sorte progession géométrique du nombre des germes et dissolution finale de tous les microbes du milieu de culture. C'est ainsi qu'il explique également les redissolutions qui s'effectuent dans les tubes de bouillon ensemencés d'un bacille lysable et renfermant très peu de bactériophage : les microbes parviennent d'abord à se développer et troublent le milieu, mais la multiplication du virus marchant très rapidement, tous ces microbes sont bientôt parasités et dissouts.

D'HÉRELLE ajoute que ce virus se comporte comme une bactérie sporulée : une culture âgée de bactériophage résiste à 1 heure de chauffage à 68°, un bactériolysat frais est rendu presque inactif après les mêmes opérations. De plus, dit-il, il sédimente et après un certain temps s'accumule dans le culot de centrifugation.

Pour KABESHIMA (1) au contraire nous avons affaire à une diastase. Nous avons vu comment il explique sa genèse et sa reproduction continuelle. Si, dit-il, une quantité extrêmement petite de principe actif lyse une culture, il se comporte en cela comme une diastase qui agit à des dilutions extrêmes. Il résiste à un séjour de 4 ans à la température ordinaire sans être repiqué. Il supporte une température voisine de 75° comme les diastases. Il résiste aux antiseptiques tels que le chloroforme, le toluène, l'alcool, l'éther et l'acide phénique. Il est soluble et reste actif dans la glycérine, conserve son activité par précipitation à l'alcool, à l'éther et à l'acétone. Il conserve son pouvoir lysant en présence d'éther et de fluorure de sodium. Jamais il ne se multiplie en milieu artificiel, il résiste à 16 chauffages à 65 et 70° et ne s'accumule pas dans le culot de centrifugation. Tels sont

---

(1) KABESHIMA : Compte-rendus de la Société de biologie du 28 février et 17 avril 1920.

les arguments de KABESHIMA pour expliquer la nature diastasique du phénomène. Nombreux, comme on le voit, sont ceux en contradiction avec les idées de D'HÉRELLE que nous avons déjà exposées et qui en plus nie les assertions de KABESHIMA relatives au chloroforme, au fluorure de sodium et à la glycérine.

Nous avons exposé plus haut, la conception de BORDET et CIUCA, qui eux aussi croient se trouver en présence d'un ferment. Leur manière de voir prend son principal point d'appui sur leurs expériences de production de bactériophage par injection intrapéritonéale d'une culture normale à un cobaye. Nous tenons à faire remarquer que nous avons essayé d'obtenir du bactériophage en suivant rigoureusement la technique indiquée par BORDET et CIUCA. Nous n'avons pas réussi. Nous avons fait un de nos essais avec du B. de SHIGA et quatre autres avec un coli très lysable, le colibacille de D'HÉRELLE. Tous furent infructueux ; pourtant nous obtenions un exsudat péritonéal très abondant.

Comme on peut s'en rendre compte par cet exposé, la lumière n'est pas faite quant à la nature du principe en question. De plus les affirmations d'un chercheur sont niées par un autre.

Devant cet état de choses, nous avons voulu nous créer une opinion basée sur une expérimentation rigoureuse. Nous avons refait la plupart si non toutes les expériences pour lesquelles il y avait discussion, de plus nous avons exécuté de nombreuses recherches nouvelles. Le résultat de ces travaux a été publié in extenso dans cette revue (1). Un point important à éclaircir et qui à notre connaissance avait été peu examiné, est celui de la dialyse du principe bactériophage. Afin d'élucider cette question, nous l'avons soumis à la dialyse. Nous employons à cet effet les membranes dialysantes, utilisées dans les essais de la réaction d'Abderhalden. Nous nous sommes assuré d'abord que les mélanges de cristalloides passaient à travers ces membranes et qu'elles étaient imperméables aux microbes.

Nous avons mis à l'intérieur d'une de ces membranes contenant un peu de bouillon, 1 cc. de bactériophage. Nous introduisons le dialyseur dans un petit vase d'Erlenmeyer renfermant du bouillon ordinaire. Nous plaçons durant 24 heures à l'étuve. Toutes ces opérations ont été faites aseptiquement. Nous ensemençons alors le bouillon du récipient, en dehors de la membrane, avec un microbe lysable : nous constatons que le développement se fait comme dans du bouillon ordinaire. D'où il résulte que le principe n'a pas franchi la membrane et ne se comporte donc pas comme un cristalloide.

Pour vérifier ces résultats, nous avons placé dans un même dialyseur 2 ou 3 cc. de bactériophage. Cette membrane est placée avec son contenu dans un local d'eau distillée stérile et abandonnée

(1) J. MAISIN et P. DEPOORTER : Archives inter. de Pharmacodynamie et de Thérapie, vol. XXV, fascicule V et VI.

2 ou 3 jours à la dialyse. Après ce laps de temps, on ne trouve pas trace de bactériophage dans le liquide extérieur. Nous avons pris soin de vérifier qu'une quantité beaucoup moindre de bactériophage (quelques gouttes) placée dans le bocal d'eau stérile de même capacité (500 cc.) conservait son activité. En effet, une goutte de ce mélange exerçait toujours une action empêchante très nette sur le développement d'un microbe lysable par lui.

Nous sommes donc certes en présence d'un colloide et comme nous l'avons prouvé précédemment (1) d'un colloide azoté, qui se comporte en beaucoup de circonstances comme une diastase : il présente une résistance anormale aux antiseptiques, il agit à des dilutions infinitésimales, il se comporte comme elles en présence des sels métalliques, et des matières colorantes d'aniline; comme elles il se laisse entraîner par des précipités qu'on forme au sein d'un liquide qui le renferme. D'autres part certaines propriétés l'écartent des ferments et cadrent mieux avec la théorie du virus. En effet, il est détruit par un contact prolongé avec la glycérine (contra diastases), il est détruit par l'alcool fort (contra diastases.)

De toute façon, il est fort probable que la lyse microbienne s'effectue comme toutes les lyses organiques par l'intermédiaire d'un ferment ; le tout est de savoir si ce ferment est le produit de la secrétion microbienne ou bien s'il est élaboré par un virus. C'est somme toute la différence qui existe entre les théories de D'HÉRELLE et de BORDET, ainsi que la signalé mon maître M. le Professeur BRUYNOGHE(2). Dans l'état actuel de nos connaissances, il serait impossible de trancher absolument ce différent, mais comme BRUYNOGHE(3), nous croyons que certaines particularités du phénomène sont mieux explicables si l'on admet la présence d'un virus, notamment les suivantes :

Dans le 1er chapître de ce travail, nous avons montré qu'un bactériophage totalement inactif pour certains microbes peut, par une symbiose appropriée, acquérir une action lytique manifeste pour eux. BRUYNOGHE est parvenu à rendre notre bactériophage primitif virulent pour une dizaine de souches de B. paratyphiques et pour plusieurs souches de bacilles typhiques en le faisant passer d'une souche sur l'autre, dès qu'il était devenu actif pour la première. Il a constaté que cette adaptation ne se faisait pas toujours suivant la filiation biologique des souches de bacilles paratyphiques. Avant nous, D'HÉRELLE, BORDET et CIUCA avaient réussi à produire de semblables adaptations. Or cette adaptation se conçoit aisément si l'on considère le bactériophage comme un être doué d'une vitalité propre, pouvant modifier ses propriétés (virulence) suivant les circon-

(1) Archives internationales de Pharmac. et de Thérapie, vol. XXV, fasc. V et VI
(2) R. BRUYNOGHE : Compte-rendus de la Soc. de Biologie du 3 juin 1921.
(3) R. BRUYNOGHE : Compte-rendus de la Soc. de Biologie du 3 juin 1921.

stances dans lesquelles il vit. De même, les microbes peuvent dans des cas déterminés, acquérir une virulence pour certaines espèces animales qu'ils n'influençaient pas d'abord.

Il y a plus : le principe lytique non seulement peut devenir actif pour des germes qui ne se laissaient pas influencer par lui, mais il peut par symbiose suffisamment prolongée avec un microbe donné, exalter sa virulence pour celui-ci alors qu'il devient sans influence aucune sur celui qu'il lysait d'abord mais avec lequel il n'est plus maintenu en contact. Nous avons développé en détails cette particularité du phénomène dans la première partie de cet ouvrage. Comment pourrait-on expliquer cette spécialisation si on refuse au bactériophage la qualité d'être vivant?

Notons en passant que des faits semblables se constatent chez les microbes : ainsi le bacille du rouget du porc peut devenir très pathogène pour les oiseaux en subissant des passages successifs par le pigeon, alors qu'il perd sa virulence première pour la race porcine (1).

Un troisième point plaide en faveur de la théorie du virus : c'est l'absence de spécificité du principe bactériophage : nous avons nettement établi ce fait dans notre 2[d] chapître : un bactériophage quelconque injecté aux animaux fournit des anticorps neutralisants pour n'importe quel autre bactériophage.

Comme le constate BRUYNOGHE si le bactériophage était un produit de sécrétion microbienne, il devrait, semble-t-il, présenter des différences suivant sa provenance, surtout si les microbes qui le secrètent sont assez éloignés l'un de l'autre : un colibacille et un bacille typhique par exemple. C'est notamment ce qui se présente pour les gélatinases ainsi que l'a montré BERTIAU (2). Celles-ci sont distinctes pour chaque microbe, car le sérum obtenu en injectant un animal avec une gélatinase donnée n'est neutralisant que pour cette gélatinase et est sans action sur le ferment secrété par une autre espèce microbienne. Il serait vraiment étonnant que notre bactériophage, ferment lytique lui aussi, s'il était de secrétion microbienne ne présentât pas la moindre spécificicité. Cela s'explique aisément au contraire si on le considère comme le produit de secrétion d'un virus toujours le même mais pouvant parasiter diverses espèces microbiennes par modification de sa virulence.

Pour terminer, disons avec BRUYNOGHE (3) que l'existence de tels virus, loin d'être une conception illogique rentre au contraire très bien dans le cadre des faits universellement reconnus en bactériologie : à côté des microbes pathogènes nous savons tous, qu'il existe des germes saprophytes d'une utilité manifeste. Dès lors pourquoi à côté des virus néfastes dont l'existence est communément

(1) BRUYNOGHE : Revue des questions scientifiques : juillet 1921.

(2) BERTIAU : Central. fur Bakt. 1914.

(3) Revue des questions scientifiques : juillet 1921.

admise, ne pourrait-on concevoir celle de virus utiles destructeurs de bactéries nuisibles ? Ainsi, également, on pourrait comprendre le rôle de tels virus dans la désinfection des milieux extérieurs, à l'instar de celui de certains saprophytes remplissant les mêmes fonctions. Comme nous ne pouvons mettre ces infiniments petits en évidence avec les moyens actuels à notre disposition, nous devons juger de leur existence par la manifestation de leur activité. La lyse microbienne découverte par D'HÉRELLE, n'en est-elle pas une?

CONCLUSIONS.

1. Le pouvoir bactériophage est un phénomène nouveau en bactériologie. On peut adapter par une technique spéciale un bactériophage à diverses souches microbiennes pour lesquelles il était inactif au début. Un bactériophage actif au début pour deux souches microbiennes peut spécialiser son action pour l'une d'elles en perdant son pouvoir lytique pour l'autre et cela en le maintenant pendant un certain temps en contact avec la première. Un microbe devenu résistant a un bactériophage, l'est aussi pour l'autre. Le bactériophage semble être sans action sur le corps des bactéries tuées par divers agents (ch. I).

2. On peut par l'injections d'animaux préparer des anticorps des divers bactériophages. Ces anticorps ne jouissent pas de la même spécificité que les bactériophages injectés, ceux d'un bactériophage donné neutralisant l'action lysante d'un autre principe lytique (ch. II).

3. Il existe des différences manifestes entre les microbes résistants et les normaux et même parmi les résistants d'une même souche. Tous les résistants ne transportent pas avec eux le principe bactério phage. Dès le début de rares résistants semblent renfermer du principe actif, la plupart au contraire n'en renferment pas. En tout cas, ceux qui en possèdent peuvent se débarrasser spontanément par la suite de cette viciation. Une fois débarrassés du pouvoir lysogène, ils ne peuvent plus le réacquérir par un nouveau contact avec le bactériophage, tant qu'ils restent résistants.

Spontanément certains résistants peuvent perdre cette propriété acquise et redevenir des individus normaux. La perte de cette qualité nouvelle se produit plus rapidement quand on les cultive en présence de sérum antilytique surtout sur milieu solide. On parvient plus aisément à rendre normal un résistant récent qu'un autre qui a séjourné longtemps en contact avec le bactériophage (ch. III).

4. Le bactériophage est un colloïde azoté. Plusieurs théories visent à expliquer le phénomène. Celle de D'HÉRELLE, disant que le pouvoir lytique doit être attribué à un virus nous semble la plus probable. C'est elle qui explique le mieux les diverses particularités du phénomène dont quelques-unes se comprennent mal, si on exclut toute vitalité au principe actif (ch. IV).

R° ISTITUTO DI STUDI SUPERIORI DI FIRENZE
LABORATORIO DI MATERIA MEDICA E TOSSICOLOGIA
DIRETTO DAL PROF. G. CORONEDI.

Studio sperimentale sull' avvelenamento da nitrobenzolo

del Dott.

M. A. MANCINI e di G. GUIDI (1)

INTRODUZIONE.

Questo lavoro trae la sua origine da un caso di avvelenamento per nitrobenzolo capitato all' osservazione dell' Istituto di Materia Medica e accuratamente studiato dal Direttore Prof. G. CORONEDI, che ne fece anzi argomento di lezione.

Poiché tali casi sono piuttosto rari (la letteratura ne registra appena un centinaio circa) pensiamo che sia utile riferirne, senz' altro, la storia.

« Nella notte sul 31 gennaio 1918, Formigli Ezio fattorino telegrafico, nel consegnare telegrammi alla stazione ferroviaria, vide al deposito merci, una damigiana, che, essendo rotta, perdeva parte del suo contenuto ed era posta sopra un catino onde recuperare il liquido.

« Attratto dall' odore gradevole, e credendolo un liquore, il Formigli ne bevve una certa quantità aspirandolo con una cannuccia. Dopo un' ora fu colto da forti dolori di ventre, ed a stento fu condotto da un compagno all' ospedale di S. Maria Nuova, ove giunse verso le sei antimeridiane. I medici di guardia, a causa dello stato comatoso in cui era entrato il malato, giudicarono inopportuno eseguire la sondatura dello stomaco e praticarono una iniezione di apomorfina che dette però scarso resultato : poi furon praticate iniezioni eccitanti e fu messo a letto. Alle dieci fu avvertito il Prof. CORONEDI, che così riferisce sulle condizioni del paziente :

« Stato di sopore profondo con risoluzione muscolare, pallore cereo diffuso a tutta « la cute abbastanza calda, e alle unghie. Labbra forse più bianche che cianotiche, « bava muco-sanguinolenta alla bocca : da questa e dalle narici emana intensissimo « odore di mandorle amare. Polso debole, non molto frequente, circa 98 al minuto, « abbastanza regolare. Respiro in apparenza normale, ma superficiale. Cute abbastanza

(1) L'idea, il piano del lavoro, l'esecuzione della parte sperimentale, chimica e tossicologica appartengono a M. AJAZZI MANCINI. — La parte anatomo-patologica appartiene a G. GUIDI.

« calda anche alle estremità; pupilla piuttosto midriatica, insensibile alla luce. Inco-
« scienza assoluta ed inerzia del corpo. Consiglio una seconda iniezione di apomorfina
« con iniezioni cardio eccitanti alternate di etere, caffeina e olio canforato; ogni due
« ore queste, ogni ora le altre. L'apomorfina non dà resultato : consiglio inoltre respi-
« razione artificiale, alternata con inalazioni di ossigeno compresso. Alle ore 11 il
« polso è divenuto filiforme ed il respiro superficiale, mentre persiste l'intenso odore
« di mandorle amare nell'alito. Raccomando di intensificare la cura aggiungendo la
« prescirizione di un' ipodermoclisi ogni due ore con cc. 100 di soluzione salata fisiolo-
« gica 0,75 % addizionata di carbonato sodico 0,25 % ; ordino anche riscaldamento del
« corpo e senapizzazioni. Sotto gli occhi si manifesta un sensibilissimo miglioramento
« del polso, che diviene più rapido e regolare con 98 battute al minuto, ed il respiro
« più profondo, 19 al minuto, a tipo toraco-addominale. Verso mezzodì l'odore caratte-
« ristico dell' alito comincia a diminuire, e alle 15 non si sente quasi più. A tale ora sotto
« l'ipodermoclisi dà segno di reagire con contrazione del viso e qualche scossa degli arti
« come per dolore. Polso e respiro discreti. Pupilla appena sensibile alla luce ; sempre
« dilatata. Alle ore 18 nessuna variazione importante nella sintomatologia, solo il
« respiro sembra un po'rumoroso, e qualche volta accenna al tipo periodico. Verso le
« ore 21 si cominciano ad osservare lunghe pause del respiro, e, senza avere osser-
« vato alcun fenomeno convulsivo, il paziente muore alle ore 23,45. »

La necroscopia che togliamo dalla relativa perizia giudiziaria fornitaci dal Prof. PICCHI, settore nell' istituto anatomopatologico, dette il seguente resultato :

« Cadavere di sesso maschile ben conformato, dell' apparente età di anni 18. Il
« colorito è pallido con chiazze cianotiche alle parti posteriori del tronco e degli arti
« con arrossamenti alla radice delle coscie e alle parti basse dell' addome. Segni di
« disinfezione con tintura di iodio e applicazione di cataplasmi tanto sul tronco quanto
« sugli arti. Rigidità conservata. Masse muscolari regolarmente sviluppate.

« *Testa.* — All' esame delle parti molli si trovano piccole punteggiature emor-
« ragiche nello spessore dei tessuti sottocutanei. La callotta asportata si presenta
« di colorito piuttosto rossastro per eccezionale sottigliezza dei due tavolati esterno
« ed interno. La dura madre ha tensione ed aspetto normali : nel seno longitudinale
« superiore è contenuto un piccolo coagulo con una discreta quantità di sangue *fluido*
« di colorito rosso bruno. Aperta la dura si trovano normali le pie meningi, normale
« tutto l'encefalo, solo si osserva tanto nelle pie meningi quanto nella massa ence-
« falica, una lieve iperemia. Notiamo qui che all' apertura del cranio si è sentito distinto
« l'odore aromatico di mandorle amare, proprio dell' essenza di mirbana o nitro-
« benzolo. Nei ventricoli cerebrali aumento del liquido cefalo-rachideo, che apparisce
« liquido e incoloro.

« *Torace.* — Asportato lo sterno, si nota subito la permanenza, con volume assai
« notevole, del timo, che misura 9 cm. di lunghezza ed è di colorito roseo scuro, di
« consistenza piuttosto marcata : nella parte alta del mediastino esistono tre ghian-
« doline linfatiche minime di colorito rosso emorragico. I polmoni sono liberi da ade-
« renze, e, all' ispezione, si osserva un colorito rossastro scuro in tutta la parte anteriore
« del lobo superiore del polmone destro. Il cuore è di volume normale ; presenta scarse e
« piccolissime punteggiature emorragiche in corrispondenza della faccia posteriore
« del ventricolo sinistro. Le valvole e gli orifici sono integri, il miocardio di colore
« quasi normale, mostra solo negli strati più interni una lieve sfumatura pallido giallo-
« gnola. Il sangue contenuto nelle cavità del cuore è di colorito rosso scuro tendente
« al bruno : parte è sempre fluido, parte è coagulato normalmente.

« Nei polmoni si riscontrano, nelle parti declivi, zone di colorito rosso bruno
« intenso, nelle quali manca quasi completamente il crepitio vescicolare. Le superfici
« di sezione sono di colorito rosso scuro, lucenti, molto saguinanti al raschiamento.

« Chiazze dello stesso colorito ma più limitate si trovano anche nei lobi superiori, « parte anteriore, dei polmoni, dove l'aereazione non è tanto ridotta o scomparsa come « nei lobi inferiori. La mucosa della laringe e della trachea è alquanto arrossata ; le « tonsille sono assai voluminose, pallide, con follicoli rammolliti ; la tiroide è di colorito « anormalmente rosso scuro. Niente di notevole nell' esofago e nella retrobocca, niente « nella cavità orale.

« *Addome*. — Fegato di volume e di peso presso a poco normali, di colorito rosso « marrone. Le superfici esterne di sezione sono lucenti, poco ricche di sangue, che è « ovunque fluido ; la cistifellea contiene in quantità discreta bile fluida giallo-ver- « dognola. La milza è piccola, di colorito roseo, ha la capsula grinzosa : sulle superfici « di sezione si nota la polpa pallida, pochissimo succosa al raschiamento, non si notano « ghiandole tumefatte in corrispondenza dell' ilo.

« I reni sono di volume normale, hanno la corticale grigia con iniezione visibile « dei vasi sanguigni, le superfici di sezione sono opache, danno al raschiamento una « discreta quantità di succo cellulare.

« Le capsule surrenali sono assai sottili, di colorito piuttosto scuro

« Lo stomaco si presenta contratto, con la mucosa tomentosa, in stato di perfetta « conservazione.

« Nell' intestino esiste lieve arrossamento della mucosa nella prima porzione del « tenue, tumefazione dei follicoli e delle placche del Payer in medio grado nell' ileo ; « tumefazine molto più marcata dei follicoli, con lieve arrossamento della muscosa « nel crasso.

« Nella vescica è raccolta in discreta quantità orina limpida : la mucosa della « parete è pallida, di aspetto normale.

« *Ossa*. — Il midollo osseo delle ossa lunghe è rosso, compatto, di aspetto fun « zionante.

« L'esame istologico dei vari organi ha dato i seguenti resultati :

« *Miocardio*. — Iniezione marcata dei capillari, focolai microscopici di emorragie

« *Timo*. — Ricco di cellule con numerosi corpi di Hassal.

« *Ghiandole linfatiche*. — Iperemia dei capillari e delle venuzze : nei seni linfatici « marcata desquamazione degli elementi endoteliali : in taluni endoteli sono inclusi « globuli rossi.

« *Milza*. — I follicoli, che sono abbondanti tanto nelle parti centrali che in quelle « capsulari, presentano : nelle prime abbondante distruzione dei nuclei, da per tutto « fagocitosi di frammenti di globuli rossi e di globuli interi. Nei ramuscoli arteriosi « minimi si ha ialinizzazione delle pareti.

« *Stomaco*. — La mucosa presenta zone di necrosi nelle quali a mala pena si « riconosce la struttura delle ghiandole tubulari ; dove le alterazioni sono meno gravi, « nella sotto mucosa, si osservano accumuli di linfociti, più numerosi e più grandi del « l'ordinario.

« *Esofago*. — Nulla di notevole.

« *Fegato*. — Fatti di lieve necrosi cellulare e di degenerazione grassa. Iperemia.

« *Reni*. — Rigonfiamento torbido e distacco delle cellule, sia nelle capsule del « Bowmann, sia nei tubuli. Disfacimento granulare di alcuni epiteli corticali : albumina « nelle capsule e nei tubuli, qualche cilindro con residui di globuli rossi. »

A completare le indagini furono eseguite ricerche sull' orina e sul sangue. Questo ha conservato l'odore caratteristico e si è mantenuto inalterato senza coagularsi né cambiare di colore per 12 giorni ; esaminato allo spettroscopio, sia al naturale, sia dopo averne cambiata la reazione, ha mostrato chiara e netta la stria della metaemoglobina accanto a quella della ossiemoglobina. Così, l'esame microscopico a fresco ha dimostrato abbondanza di globuli rossi spinosi, abbondanza

di piastrine ed una certa linfocitosi, qualche grande mononucleato con goccioline rifrangenti e qualche ombra.

L'urina esaminata chimicamente e miscroscopicamente dal Prof. PICCHI conteneva : presenza di albumina in quantità discreta (circa 1 ‰), presenza di urobilina ; nel sedimento, oltre a cellule delle vie urinarie, c'era una notevole quantità di globuli rossi, alcuni ben conservati, altri completamente privi di emoglobina, rigonfiati e trasparenti, cioè prossimi al disfacimento in seguito all' avanzata emolisi.

Contemporaneamente dal Prof. CORONEDI veniva eseguita la seguente operazione : distillò 100 gr. di urina previa acidificazione con acido cloridrico puro al 20 % : suddivise il distillato in tre parti che vennero tolte rispettivamente dopo uno, due, tre quarti d'ora di distillazione.

Né l'urina né il distillato odoravano in modo speciale ; solo nella prima porzione di questo era evidente la reazione fenolica con cloruro di ferro e acqua di bromo : nel residuo negativa la reazione del furfurolo, positivissima nei distillati dal primo al terzo in senso progressivo per intensità.

PARTE STORICA E CRITICA

Studiando la letteratura dell' argomento, mentre si è trovato che tanto il quadro clinico dell' avvelenamento acuto quanto di quello cronico sono ben noti nelle loro linee generali, come vedremo appresso, non altrettanto può dirsi del comportamento farmacologico di questo nitroderivato, né del suo meccanismo d'azione : le opinioni e i risultati sperimentali sul comportamento del nitrobenzolo nell'organismo sono talmente disparati, che abbiamo creduto opportuno di studiarlo accuratamente e i resultati delle nostre ricerche formano appunto oggetto di questo lavoro. Ma riteniamo conveniente riferire prima sommariamente qualche nota sul nitrobenzolo e sui suoi usi, e quello che conosciamo sull' avvelanamento da questo nitroderivato.

Nitrobenzolo, Nitrobenzina, Olio o essenza di mirbana ($C_6H_5NO_2$) appartiene al gruppo delle sostanza aromatiche nitrate : è un liquido scuro, insolubile in acqua, solubile in alcool, etere, acido solforico, acido nitrico, grassi e glicerina. Il VILLAVECCHIA (1) distingue tre qualità del nitrobenzolo che si trova in commercio.

1a. — *Nitrobenzolo puro leggero* (Essenza di mirbana) liquido incoloro o giallognolo, con odore gradevole di mandorle amare ; D : 1,208-1,209 ; P.E. 205°-207°.

2a. — *Nitrobenzolo greggio pesante* (Nitrobenzolo per rossi) liquido rossastro con odore di mandorle amare e di prodotti catramosi ; D : 1,18-1,19 ; P.E. 210° 220° : contiene nitrotoluoli ed omologhi.

3a. — *Nitrobenzolo pesantissimo.* — Liquido rosso bruno ; D : 1,167 ; P.E. 220° 240 ; contiene poco nitrobenzolo e molti nitrotoluoli, nitroxiloli ecc.

Il nitrobenzolo si adopera abitualmente per preparare dei colori di anilina e degli esplosivi : fraudolentemente viene adoperato in virtù del suo odore per sostituire la vera essenza di mandorle amare, molto più cara, nella fabbricazione di saponi, e perfino nella confezione di taluni liquori e confetture, che vengono con essa aromatizzati.

Mentre è raro l'avvelenamento a scopo criminoso — e se ne comprende facilmente la ragione — è relativamente frequente l' avvelenamento sia per errore, sia a scopo suicida.

MUCCIOLI (2) riferisce l'avvelenamento di un tale che, dietro consiglio di un amico, si è fatto delle frizioni di nitrobenzolo per guarire della scabbia : non è detto quale effetto abbia avùto la sostanza sulla forma morbosa, e può anche darsi che sia riuscito ad uccidere l'acaro in virtù del suo presunto potere parassiticida ; ma nel caso in parola l'applicazione cutanea del nitrobenzolo fu seguita da fatti generali così gravi, che condussero a morte il disgraziato in poco tempo.

Lo SCHILD (3) di Magdeburgo ha descritto sei casi di avvelenamento a scopo abortivo.

Sono anche da ricordare gli avvelenamenti cronici che si sono verificati in alcune fabbriche di colori dove si fa largo uso di nitrobenzolo.

***

DOSE LETALE MINIMA.

Intorno alla dose minima letale del nitrobenzolo non esiste accordo alcuno fra gli autori.

MUCCIOLI asserisce che ne occorrono 5 gr. per uccidere un cane di peso medio. CHAPUIS (4) dà per l'uomo una dose tossica da gr. 1 a 5, e fissa la dose tossica letale in gr. 5 a 15. MULLER afferma che per uccidere un uomo basta un cucchiaino da caffè. SCHENK dice che ne occorrono almeno 9 gr.

KOBERT (5) non indica neppure una dose approssimativa, ma assicura che mentre in alcuni casi sono stati sopportati senza danno 10-15 gr. di nitrobenzolo, in altri sono bastate 20 gocce a produrre l'effetto letale.

Una tale discordanza di dati può trovare la sua ragione di essere nel fatto, che in tutti questi casi noi ignoriamo troppi fattori, che sono coefficenti importantissimi per favorire o ritardare l'assorbimento e la diffusione del veleno. Così, ad esempio, la stato di vacuità o di replezione dello stomaco, la qualità dei cibi precedentemente ingeriti — se farinacei, proteici o grassi, nei quali ultimi il nitrobenzolo è di gran lunga più solubile che negli altri, la vuotatura dello stomaco o meno, e, se questa fu praticata, ha grande importanza il tempo intercorso fra l'ingestione del veleno e la lavatura. Così se uno ha preso un bicchierino di nitrobenzolo dopo un pasto abbondante, come nel caso di GRASSELLI e GIAROLI (6) e appena accortosi dell' errore, si provoca il vomito ripetutamente, ed essendo vicino ad un ospedale si può far praticare una lavanda dello stomaco, questo avvelenato ha molto maggior probabilità di sopravvivere di un altro, che abbia preso il nitrobenzolo in quantità molto minore, ma che non abbia vomitato né abbia avuto la lavanda gastrica. Inoltre c' è un altro fattore di cui occorre tener calcolo : il nitrobenzolo commerciale, che è quasi sempre la causa dell' avvelenamento, è un prodotto impuro per benzolo, acido

nitrico, nitroderivati omologhi del benzolo e talora per acido solforico le quali sostanze possono influire in grado diverso sulla sua tossicità. Vedremo più tardi, nella parte originale del lavoro, in quali limiti abbiamo fissato la d.m.m. % di peso corporeo negli animali a sangue caldo.

***

SINTOMATOLOGIA.

Secondo i diversi AA. la sintomatologia varia in funzione della dose e della via di applicazione.

Per inalazione anche a forti dosi i sintomi compaiono sollo dopo mezz' ora. Si ha cianosi ed abbassamento della temperatura, polso celere e debole, orine oscure che riducono il Fehling, poi convulsioni toniche tetaniformi, trisma, opistotono, infine morte per paralisi cardiaca.

Per ingestione se la dose è alta può avvenir la morte senza che sia preceduta da sintomi caratteristici. JOLIN (v. KOBERT) cita il caso di due lavoratori, che si addormentarono dopo aver preso un punch di acqua calda, nitrobenzolo e zucchero e furono trovati morti la mattina seguente. Assai simile è il caso pubblicato dal Dott. LEHMAN: Un operaio delle ferrovie bevve del nitrobenzolo senza presentare, lì per lì, alcun sintomo di avvelenamento acuto, salvo una certa colorazione cianotica, uno spiccato odore di mandorle amare ne l'alito : cinque ore dopo l'ingestione, l'operaio cominciò a vomitare e morì poco dopo.

Ma generalmente il quadro dell' avvelenamento può ridursi a quello prodotto dalle sostanze aromatiche : ad una breve fase di eccitamento (v. KOBERT) segue una forte depressione, che aumenta fino alla morte. Per solito dominano la scena forti dolori di stomaco, accompagnati da conati di vomito, seguiti a volte dall' emissione di contenuto gastrico, che odora sempre di mandorle amare. Si ha intensa cianosi delle labbra, delle orecchie e delle unghie, dispnea, abbassamento della temperatura ; si presenta qualche contrattura ai masseteri ; ora c'è miosi, ora midriasi. Il corpo incomincia ad essere scosso da tremore, e qui si entra nella fase di depressione, risoluzione muscolare e assopimento. L'alito e tutto il corpo in generale odorano di mandorle amare, il polso ed il respiro si fanno frequenti : si ha midriasi: subentra il coma che si accentua sempre più ; in ultimo l'avvelenato presenta un respiro periodico, e, in una pausa più lunga, muore.

Questo il quadro nello sue linee generali : vi sono poi altre particolarità che variano da caso a caso. Nel caso esaminato dal Prof. CORONEDI è mancata la cianosi, anzi tutta la cute e le mucose visibili erano piuttosto pallide che cianotiche. Il respiro, probabilmente in relazione al fatto della mancata cianosi, era presso che normale,

***

ANATOMIA PATOLOGICA.

In seguito all' avvelenamento da nitrobenzolo la rigidità cadaverica è marcatissima, e viene conservata a lungo. Secondo gli AA. nel cervello e nelle meningi si ha iperemia passiva; talora le pleure ed i polmoni presentano emorragie ora piccole ora grandi, così pure il pericardio ; il cuore è di solito fermo in diastole.

Tutti gli organi odorano fortemente di essenza di mirbana. Nell' addome : *a*) stomaco ed intestino presentano delle ecchimosi; *b*) i reni possono essere normali, mentre talora gli epiteli contengono della sostanza colorante ; *c*) la milza secondo TIERMANN conterrebbe dei granuli bruni.

Il sangue avrebbe un colore molto scuro e odorerebbe di mandorle amare : presenterebbe poichilocitosi, normoblasti e megaloblasti. Secondo alcuni allo spettroscopio il sangue presenterebbe la stria dell' ematina, secondo altri (KOBERT) vi sarebbe, oltre alla stria della metaemoglobina, una seconda a destra della stria della ematina acida, detta *striscia dei nitrobenzoli di Filehne*, dovuta ad una sostanza diversa da quelle ricordate.

Tali variazioni del sangue si otterrebbero anche in vitro mescolando sangue arterioso ed essenza di mirbana.

L'urina è scarsa e di consistenza quasi sciroppposa : è di colore oscuro. EWALD (7) dice che contiene zucchero ; VON MERING (8) asserisce il contrario. Secondo JAFFE (9) la sostanza che riduce il Fehling sarebbe acido uronitrotoluenico destrogiro, proveniente dal nitrotoluene che inquina sempre il nitrobenzolo.



COMPORTAMENTO CHIMICO BIOLOGICO.

Circa il comportamento chimico biologico della sostanza non esiste accordo tra gli AA. Vi sono di quelli a capo dei quali troviamo LETHEBY (10), OLLIVIER et BERGERON (11) i quali negano ogni azione al nitrobenzolo in sé e per sé, ma affermano che l'avvelenamento è dovuto alla sua trasformazione in anilina. Altri (GUTMANN (12), FILEHNE (13) e KOBERT) negano tale ipotesi, perché non hanno trovato tracce di anilina nei secreti normali dell' organismo e neppure nei visceri. JAFFE crede invece che il nitrobenzolo agisca in quanto si trasformi in fenolo.

Al contrario gli autori che hanno studiato l'argomento, e primi fra tutti JUDELL (14) FILEHNE e ROHL (15) sono concordi nell' ammettere che l'azione del nitrobenzolo si manifesti principalmente a carico del sangue, e del sistema nervoso centrale. Nel sangue si formerebbe metaemoglobina, che impedirebbe alle emazie di compiere il loro ufficio, di provvedere cioè allo scambio gassoso respiratorio, indipendentemente dalla via di introduzione del veleno. Inoltre il contenuto in ossigeno del sangue scenderebbe fino all' 1 %, provocando così la morte per asfissia interna.

L'azione sul sistema nervoso centrale si manifesterebbe con fenomeni depressivi e di eccitazione.



RICERCA CHIMICA DEL VELENO NEGLI ORGANI.

Il cadavere conserva a lungo l'odore di mandorle amare per la grande resistenza del nitrobenzolo ai processi putrefattivi, contrariamente a quanto succede per l'acido prussico, che si decompone con la massima facilità.

Per la ricerca chimica si può impiegare secondo il processo indicato dalla maggioranza degli autori, stomaco, intestino, polmoni, cervello : tutti questi visceri vengono finamente triturati, poi mescolati al sangue, sospesi in un pallone con acqua e sottoposti a distillazione in corrente di vapore : il distillato si tratta ripetutamente con etere solforico, si separa e si evapora : sul residuo dell' evaporazione si constata la presenza del nitrobenzolo ai suoi caratteri organolettici, e alle sue reazioni. Tale metodo di estrazione a noi ha dato soltanto scarsi resultati, ma di questo tratteremo nella parte originale del lavoro.

* * *

PROGNOSI

È diversa a seconda del modo di introduzione del veleno, delle condizioni del paziente, della tempestività o meno dell' intervento terapeutico, ecc. Generalmente però l'esito è sfavorevole.



TERAPIA.

Prima necessità : allontanare subito il veleno che eventualmente può esser rimasto nello stomaco, o a mezzo di lavanda gastrica, o di emetici, i quali non devono mai essere disciolti in veicolo oleoso, che affretterebbe l'assorbimento del nitrobenzolo rimasto nel canale intestinale, come farebbero gli analettici alcoolici, se venissero somministrati come eccitanti. Poi si applichino revulsivi cutanei, si provveda alla respirazione artificiale, si facciano inalazioni di ossigeno ed iniezioni di cardiotonici ; salasso e successiva trasfusione di sangue ; ipodermoclisi con soluzione fisiologica preferibilmente alcalinizzata. Si applichino delle bottiglie calde al corpo del paziente, specialmente se c'e tendenza alla ipotermia.

PARTE SPERIMENTALE.

Premesso che quanto abbiamo riferito concerne essenzialmente dati raccolti dalla clinica umana, e solo scarse ed incomplete osservazioni sperimentali, dall' esame analitico critico or ora esposto risulta in modo particolarmente evidente il disaccordo tra gli AA. sulla azione del nitrobenzolo negli organismi, e sulle trasformazioni che vi subisce ; allo scopo di portare un po' di luce su questo problema abbiamo intrapreso la seguente serie di ricerche sperimentali sistematiche.

Essendoci proposto il compito di studiare l' avvelenamento da nitrobenzolo quale suole verificarsi nella grande maggioranza dei casi, vale a dire per mezzo di prodotti industriali non certo chimicamente puri, abbiamo creduto opportuno di partire dai medesimi per le nostre ricerche : tuttavia non abbiamo mancato successivamente di cimentare alla prova biologica anche le varie porzioni ottenute nella distillazione frazionata delle precedenti sostanze, onde precisare l'eventuale influenza esercitata da tali impurezze sopra il quadro di azione caratteristico spettante al nitrobenzolo puro.

Non mettendo in pratica tali cautele preliminari, ci sarebbe sembrato di incorrere in errore, quando noi avessimo voluto stabilire un raffronto fra l'avvelenamento umano e quello sugli animali di laboratorio : confronto, d'altro lato, più che utile, indispensabile a chiarire il quadro sintomatico clinico descritto dagli autori, che ci hanno preceduto e verificatosi nel caso di nostra osservazione.

Si prende un campione di nitrobenzolo fornito dalla ditta Pegna e C° di Firenze (Liquido A) : ha una D. = 1,188, appartiene alla seconda categoria del VILLAVECCHIA ; è un prodotto industriale greggio ed impuro, ha colore marsala, sapore dolciastro, odora fortemente di mandorle amare. Saggiato alle carte di tornasole ha reazione spiccatamente

acida. Però, trattandosi di un liquido di un colore che può influire su quello che assume la carta di tornasole, si ripete la prova nel seguente modo : in una provetta si sbattono 3-4 cc. di nitrobenzolo con altrettanto di acqua distillata, e si lasciano separare i due liquidi ; l' acqua di lavaggio ha preso una tinta giallo canarino, ed arrossa in modo netto la carta di tornasole. Dato il metodo di preparazione tale acidità molto probabilmente è dovuta ad acido nitrico : allo scopo di avvalorare questo nostro supposto procediamo alle seguenti indagini.

I) Si prende dell' acqua di lavaggio, si filtra, e se ne lasciano cadere due o tre gocce sopra qualche cristallo di brucina, mescolata con acido solforico concentrato puro ; si ottiene una colorazione rosa che rivela la presenza di acido nitrico.

II). Qualche altra goccia del liquido di lavaggio si fa cadere su alcuni cristalli di difenilamina sciolta in acido solforico concentrato puro e dà colorazione viola pallida caratteristica.

III). Fatta una soluzione di nitron del Busch al 5 % se ne mescolano alcuni cc. con l'acqua di lavaggio su detta : si forma un abbondante precipitato cristallino di nitrato di nitron. Tale reazione, come è noto, è specifica proprio per l' ione NO_3.

Nessuna porzione poi del liquido di lavaggio, trattata con soluzione di cloruro di bario dà precipitato alcuno, e questo ci permette di escludere la presenza di acido solforico nel prodotto in esame. Cosi rimane dimostrato che quella acidità è prodotta esclusivamente da acido nitrico, come si prevedeva.

Allo scopo di togliere tali impurezze, ed avere un nitrobenzolo puro il più possibile, e che si avvicini alla prima categoria dei nitrobenzoli di VILLAVECCHIA, si ricorre alla distillazione frazionata, operando nel seguente modo : si pongono cira 700 cc. di liquido in esame in una robusta storta di vetro infusibile, che ha in alto una apertura a traverso la quale si fa passare un termometro ; al collo della storta si innesta un comune refrigerante ad acqua. Quando il termometro è arrivato a 115 ° incomincia la distillazione : allora si modera la fiamma, in maniera che il termometro non salga ulteriormente, e si raccoglie il distillato per circa mezz' ora ; tale liquido formato principalmente di benzolo e di toluolo (Liquido B) si mette in disparte. Poi portata la temperatura a 205°-207° si raccoglie ciò che distilla, cioè nitrobenzolo (Liquido C) puro leggero della prima catagoria di VILLAVECCHIA. In un terzo tempo si porta la temperatura a 209°-211° : nitrobenzolo greggio pesante (Liquido D). Si trascura di portare la temperatura a 220°-240°, perché, dato l' ambito delle presenti ricerche, non ci importa avere il liquido che distilla a tale temperatura, essendo costituito principalmente da nitrotoluoli e nitroxiloli. Il residuo della distillazione viene chiamato liquido E.

Riepilogando abbiamo cinque liquidi di cui le caratteristiche sono le seguenti.

Liquido A. — E' il campione fornito dalla ditta Pegna, tale e quale.

Liquido B. — Ottenuto con la distillazione a 115° : ha colore giallo paglierino, odora di mandorle amare, ma ha anche un altro odore, che prevale, di sostanze aromatiche. P. s. (1) 1,1175 a 12°,5 di temperatura.

Liquido C. — Ottenuto distillando a 205°-207° : di color marsala, assai simile a quello del liquido originale, odora fortemente di mandorle amare. P. s. 1,2013 a 14°,2 di temperatura.

Liquido D. — Ottenuto raccogliendo il distillato che passa fra 209°-211°. Di colore simile al precedente, ma più chiaro, e con tendenza all' arancione, odora di mandorle amare. P. s. 1;2013 a 14° di temperatura.

Liquido E. — Costituito dal residuo della distillazione : ha un color marrone scuro, odora un po' di mandorle amare. Ha un peso specifico di 1,2424 a 14° di temperatura.

A questo punto noi ci siamo sentiti in dovere di determinare a quale tipo di nitrobenzolo appartenesse quello che determinò l' avvelenamento mortale nel caso clinico studiato dal Prof. CORONEDI. Questo per la sua densità (=1,1906), per il colore, per l' intensità dell' odore ci è parso opportuno di assegnarlo alla seconda categoria dei nitrobenzoli del VILLAVECCHIA (=Liquido A).

***

ESPERIENZE SULL' AVVELENAMENTO ACUTO

Esperienze sul nitrobenzolo puro (Liquido C). — Questa prima serie di esperienze fu eseguita nei mesi di gennaio e febbraio sulle rane (rana esculenta) mantenute nei comuni recipienti di laboratorio. La stanza di studio aveva una temperatura pressochè costante di 10°-12° : il liquido venne sempre iniettato nel sacco linfatico dorsale.

Abbiamo cominciato le esperienze dal liquido C perché essendo quasi tutto nitrobenzolo commerciale, è il più adatto a darci il quadro sintomatologico tipico. Nelle esperienze che ora citiamo, nell' indicare la quantità del veleno abbiamo tenuto conto della diversità del peso specifico dei vari liquidi iniettati, perché si possano poi confrontare meglio i dati riportando tutto a volume. Data la concordanza dei resultati dei 32 protocolli sperimentali, per brevità ne riproduciamo solamente una parte.

---

(1) Questa e tutte le altre determinazioni del peso specifico sono state eseguite con la bilancia di Mohr-Westphal.

ESPERIENZE SU ANIMALI A SANGUE FREDDO.

1a *Esperienza* (21/1/1920) RANA (Rana esculenta) del peso di gr. 25.

ore 0 — Si inietta il liquido nella proporzione di 2,5 °/₀₀ di peso corporeo : dopo qualche istante si ha una fase di eccitamento motorio.

» 0,10' — Compare già una certa lentezza nei movimenti.

» 0,15' — Non è più capace di riprender la posizione abituale se posta sul dorso.

» 0,30' — E' incapace di compiere alcun movimento spontaneo; la risoluzione muscolare è completa, il respiro è raro e superficiale.

» 0,40' — Non dà segno di vita : si mette allo scoperto il cuore e si vede che pulsa ancora.

» 0,55' — Le pulsazioni sono lente, incomplete, rare.

» 3,30' — L'animale si trova morto.

2a *Esperienza* (23/1/1920) RANA (Rana esculenta) del peso di gr. 25.

ore 0 — Si inietta il liquido nella proporzione di 1 °/₀₀ di peso corporeo : la iniezione è seguita per breve momento da una fase di eccitazione caratterizzata da salti, e irrequietezza generale.

» 0, 6' — Alla fase di eccitazione è subentrata una fase di depressione molto marcata : l'animale è immobile, ed anche ripetutamente stimolato conserva la propria posizione senza reagire in alcun modo agli stimoli.

» 0,11' — Posto sul dorso non riesce a riprendere la posizione normale.

» 0,25' — Non si osserva che qualche movimento fibrillare degli arti posteriori.

» 0,35' — Reperto immodificato.

» 0,53' — Non dà più segni di vita : messo allo scoperto il muscolo gastrocnemio, si vede che reagisce allo stimolo di una lievissima corrente indotta fornitaci da una comune slitta di Dubois-Reimond, i cui rocchetti si trovano ad una distanza di 20 cm. Isoliamo il nervo sciatico e ne saggiamo la eccitabilità con lo stesso apparecchio : non reagisce che a 15 cm.

3a *Esperienza* (9/II/1920) ROSPO (Bufo vulgaris) di gr. 56.

ore 0 — Il liquido si inietta nella proporzione di gr. 1 °/₀₀ di peso corporeo.

» 0,10' — Manca qualsiasi fatto di eccitamento.

» 0,35' — Si manifestano i primi fatti di paresi : gli arti posteriori, se estesi forzatamente, invece di riprendere la posizione normale, si accavallano l'uno sull' altro.

» 1,10' — Fatti di paresi più accentuati; però risponde ancora agli stimoli e riesce a trascinarsi sul tavolo. Si fa una seconda iniezione in maniera da portare la quantità iniettata a 1,5 °/₀₀ di peso corporeo.

» 1,15' — Posto sul dorso non è capace di riprendere la posizione normale.

» 1,50' — La reazione agli stimoli è debole e lenta : il respiro ha delle pause che vanno fino a 2^{m}', il riflesso oculo-palpebrale persiste.

» 2, 5' — Il respiro si è arrestato, gli occhi sono chiusi, si preparano il muscolo gastrocnemio ed il nervo sciatico che rispondono allo stimolo della corrente indotta presso a poco nel modo già indicato nella esperienza 2a.

» 2,35' — Aperto il torace si mette allo scoperto il cuore : lo si incide e se ne aspira il sangue che si presenta di colore normale e con odore di mandorle amare.

4a *Esperienza* (10/II/1920) ROSPO (Bufo vulgaris) di gr. 54.

ore 0 — Il nitrobenzolo si inietta nella quantità di 1,5 °/₀₀ di peso corporeo.

ore 0,10' — Primi segni di insufficenza motoria.
» 0,15' — Il respiro è difficoltoso.
» 0,55' — Posto sul dorso non è capace di riprendere la posizione normale.
» 1,45' — Risponde assai lentamente agli stimoli.
» 4,45' — Il respiro è arrestato, l'animale non dà più segni di vita.
» 7,15' — Aperto il torace si vede che il cuore messo allo scoperto pulsa ancora però la diastole e la sistole non sono complete. Aperto l'addome si vede la vescica fortemente distesa. Con una siringa da iniezioni si raccolgono circa 5 cc. di urina limpidissima di un tenue colore giallo paglierino, che odora di mandorle amare: al tornasole ha reazione acida; provata col reattivo del Fehling lo ha ridotto nettamente.

5a *Esperienza* (11/11/1920) Rospo (Bufo vulgaris) di gr. 54.
ore 0 — Il nitrobenzolo viene iniettato nella proporzione di gr. 2 $^{\circ}/_{oo}$ di peso corporeo.
» 0,25' — Fatti leggeri di paralisi a carico del treno posteriore.
» 1, 5' — I movimenti sono lenti, i riflessi sono presenti ma tardi.
» 16 — L'animale non ha movimenti respiratori, gli occhi sono socchiusi il riflesso oculo-palpebrale, benché debole, pure si manifesta; stimolato fortemente, l'animale è ancora capace di qualche movimento di reazione.
» 22,5' — Il respiro è arrestato, ma il riflesso oculo-palpebrale, sebbene tenuissimo, è presente.
» 24 — E' scomparso anche questo.

6a *Esperienza* (17/11/1920) Rospo (Bufo vulgaris) di gr. 54.
ore 0 — Il nitrobenzolo viene iniettato nella proporzione di gr. 6 $^{\circ}/_{oo}$ di peso corporeo.
» 0,15' — Non essendosi ancora verificato alcun fatto di eccitazione, né di paralisi, si pratica una seconda iniezione portando la dose iniettata a 8 $^{\circ}/_{oo}$ di peso corporeo.
» 0,25' — Qualche leggero fatto di paralisi.
» 0,35' — L'animale per quanto stimolato non cammina; posto sul dorso è però capace di voltarsi, gli arti posteriori sono in estensione forzata che si accentua ad ogni più piccolo stimolo; il respiro è lento irregolare.
0,50' — Presenta delle scosse tonico-cloniche agli arti posteriori, che sono sempre in estensione, e che vi ritornano subito dopo una flessione forzata: si ha accenno all' opistotono.
» 1,15' — L'opistotono è divenuto evidente mentre continuano le scosse tonico-cloniche.
» 2,20' — Non dà più segno di vita.
» 17 — L'animale si trova morto con gli arti estesi e il tronco pure in iperestensione in una posizione assai simile a quella di una delle rane cimentate col liquido B, la cui fotografia può osservarsi in altra parte del lavoro.

ESPERIENZE SU ANIMALI A SANGUE CALDO.

7a *Esperienza* (10/11/1920) Cavia (Cavia cobaya) di gr. 272. Temperatura rettale 39.2.
ore 0 — Iniezione nel tessuto sottocutaneo nella proporzione di gr. 0,5 $^{\circ}/_{oo}$ di peso corporeo.
» 0,10' — Non presentando niente di speciale si inietta la stessa quantità di nitrobenzolo.
» 0,20' — Terza iniezione c. s.

ore 0,25' — L'animale grida senza alcun motivo apparente, ha tremore generale, andatura difficile, incerta, strascicante.

» 0,30' — Quarta iniezione c. s. si accentua il tremore, comincia a socchiudere gli occhi, ha frequenti movimenti di deglutizione. Messo a giacere riprende a stento la posizione normale: stimolato a camminare cade sul fianco per insufficenza, sopra tutto, del treno posteriore.

» 0,40' — Quinta iniezione c. s. Il nitrobenzolo così iniettato viene ad essere 2,5 °/₀₀ di peso corporeo.

» 0,45' — Posto sul fianco non tenta neppure di riprendere la posizione normale: gli arti sono scossi da leggero tremore, la respirazione è faticosa, il riflesso oculo-palpebrale è un po' tardo. Si ha estensione del tronco. Delle scosse tonico-cloniche cominciate dagli arti posteriori si generalizzano a tutto il corpo durando pochi secondi. Si sono poi ripetute ad accessi: fra un accesso e l'altro gli arti permangono contratturati.

» 0,50' — Sesta iniezione c. s. Si ripetono le scosse; gli arti sono ancora in preda a leggero tremore. La temperatura rettale è scesa a 35°,7.

» 1 — Settima iniezione c. s. La contrattura degli arti è scomparsa ed è sostituita da completa risoluzione muscolare. — Pinzettando l'animale, esso non risponde più allo stimolo, il riflesso oculo-palpebrale è presente, e così pure il riflesso acustico, che si provoca percuotendo leggermente con un' asta metallica su un piattino di porcellana; l'animale a tale rumore, come ad altri consimili, risponde con una scossa tonica generalizzata a tutti i muscoli.

» 1,10' — Ottava iniezione. Il riflesso oculo-palpebrale è scomparso, persiste l'acustico, la respirazione è divenuta rumorosa.

» 1,20' — Nona iniezione con la quale all' animale si è somministrato complessivamento gr. 4,5 di liquido per °/₀₀ di peso corporeo. Il respiro si è fatto superficialissimo, l'animale ha ogni tanto qualche scossa muscolare.

» 2 — Il respiro è preagonico, scomparsi tutti i riflessi ad eccezione dell'acustico.

» 3,40' — E' scomparso anche quest' ultimo.

» 4 — L'animale non dà più segno di vita; aperto l'addome ed il torace si avverte intenso l'odore di mandorle amare. Il cuore ha ancora qualche rara pulsazione atriale.

8a *Esperienza* (11/11/1920) Cavia (Cavia Cobaya), del peso di gr. 307 — temperatura rettale 37°,9.

ore 0 — Iniezione pari a gr. 3,3 °/₀₀ di peso corporeo.

» 0,5' — Si possono già apprezzare segni di insufficenza muscolare.

» 0,10' — L'animale non è capace di reggersi sulle gambe; il respiro si è fatto assai difficile; gli arti sono in leggera contrattura, presenti i riflessi.

» 0,25' — Si sono accentuati i fatti di paralisi; l'animale non può fare che piccolissimi movimenti; il respiro si è fatto superficiale ed irregolare; anche il tronco è leggermente contratto e flesso; temperatura rettale 35°,7.

» 0,35' — Riflessi ancora presenti; ogni tanto l'animale entra in preda a scosse tonico-cloniche, ora limitate a qualche gruppo muscolare, ora generalizzate a tutto il corpo.

» 0,50' — Ha gli occhi chiusi; i riflessi pur essendo presenti sono molto attenuati.

ore 1,20' — E' scomparso il riflesso oculo-palpebrale ; a stimoli cutanei l'animale reagisce in modo inadeguato ; il respiro si è fatto superficiale.
» 1,45' — I movimenti respiratori sono appena manifesti ; dei riflessi permane soltanto l'acustico.
» 2, 5' — E' scomparso anche quest' ultimo.
» 4 — L'animale non dà più segno di vita ; ha emesso urina che si raccoglie in quantità di 2 cc. questa è di colore giallo paglierino, torbida, non riduce il Fehling.

9a *Esperienza* (18/11/1920) CAVIA (Cavia Cobaya), del peso di gr. 160 temperatura rettale 37°,5.
ore 0 — Iniezione pari a gr. 10 °/oo di peso corporeo.
» 0,15' — Leggeri segni di paresi a carico del treno posteriore l'animale stride continuamente senza apparente ragione.
» 0,25' — Si abbatte sul fianco ; stride continuamente : gli arti si muovono celermente e in modo coordinato come nella corsa.
» 0,35' — Presenta scosse tonico-cloniche ora localizzate a qualche gruppo muscolare, ora generalizzate. Gli arti, anche nei periodi di pausa, sono sempre scossi da tremore ; i contorni della cavità nasale e buccale hanno perduto il loro colorito roseo, ed hanno acquistato una tinta violacea ; il riflesso acustico è spiccatissimo.
» 0,45' — Agli arti il tremore ha preso il sopravvento sopra ogni altro movimento ; solo ogni tanto è interrotto da scosse più forti ; l'animale ha perduto urina, che non è stata potuta raccogliere. La respirazione si è fatta difficile.
» 0,55' — Il riflesso oculo-palpebrale è scomparso, mentre permane marcatissimo l'acustico ; continuano il tremore e le scosse muscolari.
» 1, 5' — Anche il margine palpebrale ha assunto una tinta bluastra.
» 1,25' — Sintomatologia quasi invariata ad eccezione del respiro che si è fatto difficilissimo.
» 3,45' — L'animale si trova morto.

Da questa serie di esperienze si possono desumere la seguenti osservazioni circa l'azione generale della sostanza in esame.

1°. — Negli *animali a sangue freddo* : A) i fatti di eccitazione appena accennati nelle rane sono più marcati nei rospi, ma tanto negli uni come nelle altre sono di gran lunga inferiori ai fatti di paresi che hanno sempre il sopravvento, sia per intensità che per durata.

B). — La sostanza ha azione sul sistema nervoso centrale, e non sul periferico.

2°. — Negli *animali a sangue caldo* : A). si manifesta e persiste per lungo tempo in modo evidentissimo il riflesso acustico, che è l' ultimo a scomparire.

B). — La sostanza ha azione centrale e non perferica.

C). — Si hanno fenomeni di eccitazione che si verificano sotto forma di convulsioni tonico-cloniche o semplicemente toniche, la quali si presentano a poca distanza dai fatti di paresi, che sono sempre prevalenti in special modo quando la sostanza venga propinata in dose rilevante.

***

ESPERIENZE SUL LIQUIDO A.

Riteniamo opportuno di far seguire a queste esperienze, quelle eseguite sul liquido A, cioè sul nitrobenzolo greggio commerciale non trattato in alcun modo da noi, e questo per le seguenti principali ragioni :

a). perchè è il campione che più si avvicina a quello che servì per l' avvelenamento da cui abbiamo preso le mosse per questo lavoro ;

b). perchè è il campione che più si avvicina per contenuto e per i suoi caratteri chimico-fisici al nitrobenzolo puro sopra cimentato ;

c). per accertarsi se il prodotto greggio — ordinariamente causa di questi avvelenamenti — sia più o meno tossico della sostanza pura, e presenti deviazioni notevoli nel quadro sintomatologico.

ESPERIENZE SU ANIMALI A SANGUE FREDDO.

10a *Esperienza* (12/11/1920) RANA (Rana esculenta) di gr. 22.

ore 0 — Iniezione pari a 0,8 °/₀₀ di peso corporeo.
» 0,20' — Movimenti respiratori deboli.
» 0,30' — L'animale ha lievi fatti di paresi agli arti : si fa un' altra iniezione portando il liquido iniettato a 1,5 °/₀₀ di peso corporeo.
» 0,35' — Posto sul dorso non è capace di voltarsi malgrado i tentativi che fa per riprendere la posizione normale ; gli arti sono in preda a scosse tonico-cloniche.
» 0,40' — L'animale può camminare con grande difficoltà. Stimolato mediante pinzettamento di un arto ha delle scosse tonico-cloniche.
» 0,50' — Se ne estendiamo forzatamente gli arti, l'animale non riesce a fletterli completamente, neanche dopo forti e ripetuti stimoli.
» 1 — I movimenti respiratori sono appena percettibili ; lo stimolo portato sugli arti provoca appena piccolissime scosse.
» 1,15 — Il respiro è arrestato ; i riflessi però sono debolissimi eccettuato quello acustico che è molto evidente.
» 1,25' — L'animale pare morto, non respira e non risponde a nessuno stimolo.
» 1,30' — Ha ripreso un po' ; si vedono dei movimenti respiratori e qualche piccola contrazione degli arti.
» 1,45' — Non dà più segno di vita.

11a *Esperienza* (13/11/1920) RANA (Rana esculenta) di gr. 25.

ore 0 — Iniezione pari a 1,5 °/₀₀ di peso corporeo.
» 0,15' — Primi fatti di paralisi a carico degli arti posteriori.
» 0,25' — Non è più capace di voltarsi se posto sul dorso ; il respiro è lento ; i riflessi sono piuttosto esagerati
» 0,35' — I riflessi si accentuano : basta toccare un punto qualsiasi del corpo per produrre una scossa generale.
» 0,45' — Si ha qualche raro movimento respiratorio ; i riflessi sono presenti
» 0,55' — E' scomparso ogni segno di vita.
» 1,40' — Messo allo scoperto il cuore si vede che ha ancora qualche rara ed incompleta pulsazione.

12a *Esperienza* (13/11/1920) ROSPO (Bufo vulgaris) di gr. 54.

ore 0 — Il liquido viene iniettato nella proporzione di gr. 2 °/₀₀ di peso corporeo.

ore 0,15' — Non presentando l'animale niente di notevole, si fa una seconda iniezione portando la quantità a gr. 3 °/oo di peso corporeo.

» 0,25' — Primi segni di paresi.

» 0,35' — I fatti di paralisi si sono tanto accentuati che l'animale non può più voltarsi se posto sul dorso; i riflessi sono tardi; il respiro difficile.

» 1 — La paralisi è ancora progredita.

» 1,30' — Non dà più segni di vita.

ESPERIENZE SU ANIMALI A SANGUE CALDO.

138 *Esperienza* (14/11/1920) CAVIA (Cavia cobaya) di gr. 165 temperatura rettale 38°,5.

ore 0 — Il liquido viene iniettato nella proporzione di gr. 3,5 °/oo di peso corporeo.

» 0,15' — L'animale eseguisce movimenti di deglutizione; presenta una certa lentezza nei movimenti degli arti.

» 0,17' — Si fa una seconda iniezione in maniera da portare il liquido iniettato a gr. 5 °/oo di peso corporeo.

» 0,20' — L'animale è scosso da un tremito e cade sul fianco, ma rialzato è ancora capace di reggersi.

0,30' — Si abbatte perché gli arti posteriori sono incapaci di sostenerlo non così gli anteriori. I muscoli della testa non presentano alcun segno di paresi.

» 0,35' — Ha scosse tonico-cloniche; i riflessi sono presenti.

» 0,45' — L'animale rialzato si è di nuovo abbattuto sul fianco. Le zampine sono in preda a movimenti ritmici e coordinati come nel camminare. I riflessi sono esagerati, primo fra tutti l'acustico che si provoca anche con stimoli minimi.

» 0,55' — Il respiro si è fatto superficiale ma i riflessi permangono ancora esagerati. Basta un piccolo stimolo sulla cornea per provocare una scossa generale.

» 1,15' — Il sacco congiuntivale è pieno di lacrime. Condizioni generali immutate.

» 1,35' — Il respiro si è fatto superficialissimo. I riflessi sono ancora presenti: di questi il più marcato è l'acustico.

» 4,30' — L'animale non dà più segno di vita. Aperto il torace si constata che il cuore non pulsa più.

Da tali esperienze si possono desumere la seguenti osservazioni generali:

1°). Il nitrobenzolo greggio del commercio dà una sintomatologia pressoché uguale a quella del prodotto puro; ma i fatti di eccitazione, anche con dosi relativamente piccole, sono più evidenti che col prodotto C;

2°). la sua tossicità rispetto al prodotto puro risulta inferiore approssimativamente di una volta e mezzo.

***

ESPERIENZE SUL LIQUIDO B.

Il prodotto ricavato con la distillazione del nitrobenzolo a 115° è costituito in gran parte da benzolo impuro per tracce di nitrobenzolo.

che gli impartisce marcato odore di mandorle amare : l' alta percentuale di benzolo in questo campione venne identificata, oltre che per le sue costanti fisiche, facendo la prova dell' infiammabilità : infatti mentre questo capione arde immediatamente appena messo in contatto con un fiammifero acceso, gli altri campioni A, C, D, E, non ardono affatto nelle stesse condizioni. Il liquido B ha reazione intensamente acida.

ESPERIENZE SU ANIMALI A SANGUE FREDDO.

14a *Esperienza* (14/11/1920) RANA (Rana esculenta) di gr. 16.

ore 0 — Il prodotto viene iniettato nella proporzione di gr. 1 °/₀₀ di peso corporeo.

» 0,15' — L'animale ha perduto la sua vivacità.

» 0,20' — Non è capace di voltarsi se posto sul dorso, però i riflessi sono pronti.

» 0,30' — Si pratica una seconda iniezione pari a metà della precedente, con la quale si porta il quantitativo iniettato a gr. 1,5 °/₀₀ di peso corporeo. Posta sul dorso non ha che lievi scosse muscolari ; riflessi ancora vivaci, basta toccare una zampa per provocare la contrazione localizzata agli arti omolaterali, e talora generalizzata.

» 0,50' — Gli occhi sono chiusi, il respiro sembra arrestato, i riflessi sono presenti ed esagerati ; il tronco e la testa sono iperestesi (V. fotografie).

» 20 — Non dà alcun segno di vita, però, se stimolato, risponde debolmente.





15a *Esperienza* (18/11/1920) RANA (Rana esculenta) di gr. 17.

ore 0 — Iniezione di gr. 2 °/₀₀ di peso corporeo.

» 0,10' — L'animale à molto agitato : salta continuamente e con maggior vivacità del consueto.

» 0,15' — Continua lo stato di agitazione.

ore 0,20' — Alla eccitazione è succeduta una immobilità altrettanto considerevole : non salta neppure dopo ripetuti stimoli.

0,25' — Si nota un certo grado di opistotono ; riflessi presenti.

0,35' — L'opistotono si è fatto marcatissimo : l'animale può eseguire solo movimenti molto limitati, né è capace di voltarsi se posto sul dorso.

» 0,50' — Altra iniezione pari a matà della precedente con la quale si porta a gr. 3 °/oo il prodotto iniettato.

» 0,55' — I riflessi sono esgerati. Basta toccare leggermente con una punta un occhio chiuso per avere una scossa di tutto il corpo.

» 1,30' — Altra iniezione che porta la quantità di liquido a gr. 4 °/oo ; i riflessi sono esagerati, c'è ancora qualche movimento respiratorio, raro e superficiale.

» 2,10' — I riflessi sono sempre vivaci ; l'opistotono è ancora molto accentuato.

» 18 — L'animale non dà più segno di vita.

16a *Esperienza* (31/III/1920) ROSPO (Bufo vulgaris) del peso di gr. 60.

ore 0 — Il liquido viene iniettato nella proporzione di gr. 7,5 °/oo di peso corporeo.

» 0,30' — Si può solo apprezzare una certa lentezza nei movimenti e il respiro piuttosto stentato.

» 0,40' — L'animale che è con la testa iperestesa, ha segni manifesti di insufficenza, specialmente del treno posteriore; messo sul dorso riprende a stento la posizione normale.

» 0,50' — Negli arti ha manifesta contrazione dei gruppi muscolari ; se rovesciato non riesce più a riportarsi nella posizione consueta ; la testa è iperestesa.

» 1 — L'opistotono è marcatissimo ; gli arti sono mantenuti rigidi in estensione ; il respiro ha delle lunghe pause.

» 1,30' — Il respiro è arrestato ; gli arti, specialmente i posteriori, cominciano a presentare risoluzione muscolare.

» 2 — La risoluzione si è fatta completa ; l'animale presenta un debole riflesso oculo-palpebrale.

» 5 — E' morto. Aperto l'addome si trova la vescica fortemente distesa : a mezzo di una siringa di Pravaz si estraggono circa 5 cc. di urina la quale viene cimentata col reattivo del Brunner per il nitrobenzolo con esito negativo : pure negativa è stata la ricerca delle sostanze riducenti col reattivo del Fehling.

ESPERIENZE SU ANIMALI A SANGUE CALDO.

17a *Esperienza* (31/III/1920) CAVIA (Cavia cobaya) di gr. 280 di peso corporeo : temperatura rettale 37°,9.

ore 0 — Il prodotto viene iniettato nella proporzione di gr. 10 °/oo di peso corporeo nelle parti laterali del tronco, tessuto sottocutaneo : l'iniezione si pratica in tre tempi dato il volume del materiale : prima iniezione.

» 0,15' — Nessun fatto degno di nota : seconda iniezione.

» 0,20' — L'animale ha il respiro rumoroso.

» 0,30' — Condizioni invariate : terza iniezione.

» 0,40' — L'animale è dispnoico ; non può reggersi affatto sulle gambe e si abbatte.

» 0,50' — Presenta i soliti movimenti degli arti, alternati e ritmici, frequenti come se camminasse : ha avuto qualche scossa tonicoclonica ; la temperatura rettale è scesa sotto i 34° ; gli arti anteriori sono caldi mentri i posteriori sono molto freddi.

ore 1 — I movimenti sono cessati : l'animale presenta solo del tremore ; i riflessi sono presenti, l'acustico è sensibilissimo.
» 1,20' — Si ha una ripresa dei movimenti a tipo ambulatorio su ricordati, però è di breve durata.
» 1,40' — Anche le zampe anteriori e le orecchie sono divenute fredde.
» 2 — Continua il tremore.
» 2,20' — Il tremore si è notevolmente attenuato.
» 5 — L'animale è morto.

Allo scopo di eliminare il dubbio che la sintomatologia rilevata nelle esperienze eseguite col prodotto B sia in parte dovuta alle impurità acide del prodotto greggio, che con la distillazione a 115°, possono esser passate in questa prima parte del distillato, lo si purifica nel modo seguente :

In un imbuto separatore si pongono circa 10 cc. di liquido B a cui si aggiungono circa 30 cc. di una soluzione di soda caustica al 3 % ; si sbatte forte, indi si allontana la soluzione alcalina di lavaggio e si ripete per quattro volte l' operazione ; poi si passa il prodotto attraverso un filtro seccato alla stufa ; il liquido B così lavato non dà più reazione acida alla tocca con una cartina di tornasole. Lo si esperimenta poi nelle stesse condizioni dell' altro.

18a *Esperienza* (1 /IV /1920) CAVIA del peso di gr. 270 ; temperatura rettale 38°,2.

ore 0 — Iniettiamo nel cellulare sottocutaneo in tre tempi, una quantità di liquido B lavato, pari al 10 °/₀₀ di peso corporeo : prima iniezione.
» 0,10' — L'animale è agitato, corre a destra e a sinistra stride, digrigna i denti, si gratta ripetutamento il muso.
» 0,15' — Seconda iniezione.
» 0,20' — Il periodo di eccitazione è andato esaurendosi ; la cavia si è fermata e trema.
» 0,30' — Terza iniezione : l'animale si regge male sulle zampe basta una piccola spinta per farlo cadere.
» 0,35' — Tenta di camminare, ma cade per insufficienza del treno posteriore.
» 0,40' — Impossibilitato a reggersi, si è completamente abbattuto, e presenta agli arti i soliti movimenti alternati, ritmici e coordinati della corsa.
» 0,50' — I movimenti degli arti si sono notevolmente attenuati.
» 1, 5' — C'è il solito tremito a piccole scosse ; il respiro è un po' frequente e superficiale. La bocca è piena di materia verdastra, il riflesso oculo-palpebrale è torpido, violentissimo quello acustico.
» 1,35' — Il respiro è piccolo superficiale ; esiste un leggero tremore; il riflesso oculo-palpebrale è scomparso mentre l'acustico è ancora prontissimo.
» 2,15' — Sintomatologia pressoché invariata, solo il respiro è divenuto molto irregolare.
» 5 — L'animale si trova morto.

Allo scopo di rilevare quale parte aveva nella sintomatologia il gruppo benzolico si sono eseguite le seguenti esperienze con del benzolo purissimo di MERCK.

19a *Esperienza* (25/V/1921) CAVIA di gr. 385 temperatura rettale 37°,2.

ore 0 — Iniettiamo cc. 0,2 di benzolo.

» 0,10' — L'animale mostra di non aver risentito per niente dell' azione del farmaco, se si toglie l'alito odorante di benzolo ; non fatti di eccitazione né di depressione.

» 0,25' — Iniez. di cc. 0,25 : l'animale stride un poco.

» 0,30' — La cavia sta ferma, ma la testa e gli orecchf sono in preda a leggeri tremori ; niente fatti di eccitazione, nè di paresi.

» 0,45' — Altra iniezione di cc. 0,25. L'animale stride per un momento restando calmo ; riflesso acustico marcatissimo.

» 0,50' — Il riflesso acustico è sempre vivace ; l'animale adagiato sul fianco stenta a rialzarsi ; c'è tremore marcato ; agli arti posteriori fatti paretici marcati.

» 1,20' — Lieve stato di eccitazione. Iniezione di 0,5 cc.

» 2,10' — Nessun fatto nuovo : altra iniez. di 0,5 cc.

» 2,15' — Altra iniez. di 0,5 cc.

» 2,30' — L'animale presenta parèsi del treno posteriore ; messo sul fianco stenta a rialzarsi. Notevole ipotermia.

» 2,40' — Qualche rara scossa.

» 2,50' — Cammina a stento : tutto l'animale, ma specialmente la testa è agitata da tremore.

La mattina dopo l'animale non ha più nulla e si riprende l'esperienza : la temperatura è 36°,5.

» 18 — Iniez. di cc. 0,5 : di tanto in tanto ha tremito a fini movimenti.

» 18,10' — Aumenta il tremito, specie se stimolata ; messa sul fianco stenta a rialzarsi, e durante questi sforzi l'arto sollevato si irrigidisce.

» 18,15' — Iniez. di cc. 0,5.

» 18,20' — Altra iniez. di cc. 0,5 : la paresi si accentua, specie agli arti posteriori.

» 18,25' — Altra iniez. di cc. 0,5.

» 18,30' — Altra iniez. di cc. 0,5. Caduta, non riesce a rialzarsi da sé, abbandona la testa sulle zampe anteriori. Temperatura rettale 36°,5.

» 18,40' — Altra iniez. di cc. 0,5.

» 18,45' — Altra iniez. di cc. 0,5 : non compie più movimenti volontari : gli arti posteriori sono estesi; oltre al consueto tremore a piccole scosse, ha qualche tremito più forte. Non stride affatto.

» 19,15' — Altra iniez. di cc. 0,5 : tremore più intenso; temperatura rettale 34°,8.

» 19,35' — Altra iniez. di 0,5 cc.: è immobile.

» 19,45' — Altra iniez. di cc. 0,5. L'occhio dell' animale è divenuto lacrimoso.

» 20 — Altra iniez. di cc. 0,5. Persistono le condizioni ultimamente ricordate.

» 22,30' — Riflesso acustico e congiuntivale presente : lievi tremori agli arti.

» 23,20' — Altra iniezione di cc, 0,5. Movimenti volontari completamente aboliti : degli involontari sono presenti i riflessi soliti ed il tremore fine. La respirazione è sbadigliante.

» 23,30' — L'animale muore.

Da tali esperienze siamo autorizzati a fare le seguenti osservazioni generali :

1°). che il liquido B come gli altri provoca una notevole ipotermia ;

2°). che come di consueto il quadro sintomatologico è caratterizzato da fatti di eccitazione, intrecciati con fatti di depressione piuttosto prevalenti ;

3°). che il prodotto è quasi quattro volte meno tossico del liquido C;

4°). che la tossicità di questo prodotto è superiore a quella del benzolo puro, il quale ha ucciso l'animale presso a poco nello stesso tempo del liquido B (ore 5 circa), con la differenza però che mentre del liquido B ne è stato iniettato nella proporzione dell 10 ‰ di peso corporeo, il benzolo puro di MERCK venne iniettato nella proporzione del 12,40 ‰.

Cimentando con il benzolo puro abbiamo potuto constatare poco dopo la prima iniezione che l'alito della cavia odorava fortemente di benzolo : certo questo prodotto anche per il suo basso punto di ebullizione (80°) viene eliminato con grande rapidità attraverso l' apparato respiratorio e questo spiega perché lo stesso animale che aveva avuto il giorno innanzi, per via ipodermica il 4,50 ‰ di p. c. di questo prodotto, abbia presentato turbe funzionali di cosi poca entità, di modo che il mattino appresso era tornato in perfette condizioni di salute.

***

ESPERIENZE SUL PRODOTTO D.

Date le grandi somiglianze che intercorrono tra questo prodotto e il liquido C, è presumibile che la sintomatologia offertaci dal liquido in esame differisca poco da quella del C.

ESPERIENZE SU ANIMALI A SANGUE FREDDO.

20a *Esperienza* (18/II/1920) RANA (Rana esculenta) del peso di gr. 26.

ore 0 — Iniezione nella proporzione dell' 1 ‰ di p.c.
» 0,15' — Si avvertono i primi fatti di paralisi a carico del treno posteriore.
» 0,22' — L'animale non è più capace di voltarsi se posto sul dorso.
» 0,30' — Gli occhi sono socchiusi, la respirazione è irregolare; ogni tanto ha qualche scossa muscolare.
» 0,45' — Il respiro si è fatto ancora più irregolare, i riflessi sono assenti.
» 1 — Il respiro è arrestato. L'animale non reagisce stimolandogli un arto con una pinzetta.
» 2,15' — L'animale in apparenza è morto, ma apertone il torace si osserva che il cuore ha qualche rara pulsazione.

21a *Esperienza* (19/II/1920) ROSPO (Bufo vulgaris) di gr. 58.

ore 0 — Iniezione pari a gr. 1,5 ‰ di peso corporeo.
» 0,20' — Primi segni di paresi negli arti posteriori.
» 0,50' — L'animale non è più capace di riprendere la posizione normale se posato sul dorso.
» 1 — La reazione agli stimoli è molto lenta.
» 1,20' — Il respiro si è fatto irregolare e difficoltoso.
» 1,50' — La reazione agli stimoli è ancora affievolita.
» 24 — L'animale non dà più segni di vita.
» 48 — Ha un po' ripreso : ha qualche movimento respiratorio ed è capace di riprendere la posizione normale se posto sul dorso.
» 60 — L'animale è come intontito cammina stentatamente e la respirazione è difficoltosa.
» 96 — L'animale è morto.

ESPERIENZE SU ANIMALI A SANGUE CALDO.

22a *Esperienza* CAVIA (Cavia cobaya) del peso di gr. 155. Temperatura rettale 37°,5.

ore 0 — Iniezione pari a gr. 3,3 $^{0}/_{00}$ di p.c.
» 0,15' — L'animale è come assonnato, e sta tutto raggomitolato su sé stesso a volte trema; ha forte scialorrea; stimolato non tenta fuggire.
» 0,25' — Cammina a stento, ed ogni tanto minaccia di cadere per l'insufficenza di uno degli arti posteriori.
» 0,35' — L'animale si è completamente abbattuto e non riesce a rialzarsi. Temperatura rettale inferiore a 34°.
» 0,45' — Ha delle scosse convulsive tonico-cloniche generalizzate · gli arti hanno i soliti movimenti ritmici e coordinati della corsa.
» 0,55' — I contorni del naso e della bocca hanno assunto una tinta violacea; il riflesso corneale è presente, l'acustico marcatissimo.
» 1,10' — I movimenti coordinati della corsa sono più attenuati, mentre il corpo è agitato ogni tanto da scosse convulsive di notevole intensità.
» 1,35' — Gli arti e il corpo sono in istato di continua agitazione.
» 1,50' — Sintomatologia immutata.
» 2,10' — Idem.
» 4,30' — L'animale è morto, ha perduto urina nella misura di circa un cc., che raccolta si presenta di aspetto limpido, di colore giallo paglierino, non riduce il liquido del Fehling.

La sintomatologia presentata dal liquido D è presso che identica a quella data dagli animali cimentati con liquido C (nitrobenzolo purificato) :anche qui si ha ipotermia marcata e gli stessi fenomeni a carico del sistema nervoso centrale. L'animale però ha presentato una forte scialorrea. La tossicità del prodotto è leggermente inferiore a quella del liquido C.



ESPERIENZE ESEGUITE COL LIQUIDO E
(residuo della distillazione)

Sebbene questo campione sia costituito principalmente dalle impurità del nitrobenzolo greggio, concentrate in seguito alla distillazione dei precedenti campioni, e non contenga presumibilmente che traccie di nitrobenzolo, pure lo abbiamo voluto studiare, onde conoscere meglio quale parte nella sintomatologia delle comuni intossicazioni da nitrobenzolo commerciale sia da attribuirsi al nitrobenzolo, e quale alle impurità.

ESPERIENZE SU ANIMALI A SANGUE FREDDO.

23a *Esperienza* (19/II/1920) RANA (Rana esculenta) di gr. 26 di peso corporeo.

ore 0 — Iniezione pari a gr. 1 $^{0}/_{00}$ di p. c.
» 0,10' — Il respiro è più raro.
» 0,20' — Il respiro si è superficializzato.
» 0,25' — Si manifestano i primi segni di paresi.

ore 0,30' — Posto sul dorso non è capace di voltarsi ; il respiro è arrestato.
» 0,40' — E' ancora capace di qualche piccolo movimento.
» 1, 5' — Non è più capace di flettere gli arti, però risponde allo stimolo meccanico.
» 1,20' — Non risponde più, neppure allo stimolo meccanico.

24a *Esperienza* (19/II/1920) Rospo (Bufo vulgaris) di gr. 48 di peso corporeo.
ore 0 — Iniezione in ragione del 1,5 °/oo di p.c.
» 0,25' — Si notano i primi leggeri segni di paresi a carico degli arti posteriori.
» 0,40' — La respirazione è difficoltata ed irregolare.
» 1 — Paresi accentuata agli arti posteriori.
» 1,40' — Stimolato, reagisce ancora, ma se lo si mette sul dorso non è capace di rivoltarsi.
» 2 — Non compie più alcun movimento volontario; respira stentatamente; reagisce ancora agli stimoli.

ESPERIENZE SU ANIMALI A SANGUE CALDO.

25a *Esperienza* (22/II/1920) Cavia (Cavia cobaya) di gr. 435. Temperatura rettale 37°3
ore 0 — Iniezione in ragione di gr. 3,3 °/oo di p.c.
» 0,20' — L'animale sembra assonnato ; ha la respirazione difficile ed irregolare.
» 0,35' — La sonnolenza è aumentata, gli occhi si chiudono ; ogni tanto corre pericolo di cadere per l'insufficienza di un arto ; ma non cade, si riprende, e nel riprendersi apre gli occhi.
» 0,55' — Iniziano leggeri segni di paresi.
» 1 — La temperatura rettale è scesa sotto i 34°.
» 1,15' — Presenta probabile scialorrea cui riteniamo dovuti i frequenti movimenti di deglutizione che compie.
» 1,30' — Compie qualche passo, ma la deambulazione è assai stentata.
» 2 — L'animale non cerca di moversi, sebbene lo possa ; si raggomitola ; le estremità vanno perfrigerandosi ; il respiro è raro e si compie evidentemente col concorso dei muscoli accessori.
» 5 — L'animale si è completamente abbattuto. Il respiro è irregolare, difficoltoso. I riflessi sono ancora presenti ma si hanno solo con stimoli molto forti.
» 5,45' — Si ha forte scialorrea. I contorni del naso e della bocca hanno assunto una tinta violacea, anche le zampine sono cianotiche e freddissime.
» 6 — L'animale è in istato agonico : perde urina che raccolta e cimentata col liquido del Fehling lo riduce.
» 6,20' — Si è spento ogni segni di vita.

In queste esperienze la nostra osservazione è richiamata dal fatto che il liquido E non provoca alcun fatto di eccitazione, mentre i fatti depressivi si manifestano subito ; che questo, al pari degli altri, provoca rapidamente una notevole ipotermia ; e che infine le urine della cavia avvelenata hanno ridotto il liquido del Fehling.

ESPERIENZE SULL' AVVELENAMENTO SUBACUTO E CRONICO.

Esaurito così lo studio sulla sintomatologia dell' avvelenamento acuto, abbiamo iniziato la seguente serie di esperienze dirette prima

di tutto a studiare il decorso ed il quadro dell' avvelenamento subacuto e cronico, provocato somministrando giornalmente quantità minime di nitrobenzolo, e nel tempo stesso dirette a fornirci il materiale necessario per le indagini chimiche e tossicologiche.

26a *Esperienza.*

Due cavie di circa mezzo Kgr. cadauna vengono isolate per disciplinarne il regime alimentare e per sorvegliarne metodicamente le urine prima di iniziare l'avvelenamento cronico. Questo periodo di osservazione si è prolungato per 5 giorni. Alle due cavie insieme si è somministrata una razione giornaliera complessiva di

fieno gr. 100
avena gr. 100
cavolo gr. 300 : tale razione veniva consumata interamente nelle 24 ore e si mostrava sufficiente a mantenere normale il bilancio nutritivo. L'albumina e il glucosio sono state ricercate ogni giorno : quella con acido acetico a ferrocianuro di potassio, questo col reattivo del FEHLING sulle urine defecate con soluzione di acetato neutro di piombo e successivamente trattate con carbonato di sodio ; ma l'una e l'altra ricerca sono state sempre negative. Trattata col reattivo di Nielender l' urina formava una nubecola di colore rosso sporco, ma non ottenemmo mai il precipitato caratteristico del bismuto ridotto.

Fatte queste constatazioni iniziamo la somministrazione del veleno.

La Cavia gialla (che nei protocolli verrà indicata con la sigla G_1) all' inizio degli esperimenti aveva un peso di gr. 665, L' altra bianca (che sarà contrassegnata con la sigla B_1) pesava gr. 585. Il liquido cimentato è quello C. Le iniezioni vengono praticate sempre nel cellulare sottocutaneo dei lati del tronco. Si esaminano frequentemente le urine e per maggior semplicità raccogliamo qui i dati che non subiscono variazioni di sorta durante la osservazioni, mentre inseriamo nel seguente prospetto quei dati che presentano delle modificazioni. Fra i primi ricordiamo che l' aspetto è sempre molto torbido come tutte le urine degli erbivori, così pure la reazione è sempre alcalina; il glucosio è assente, così pure i pigmenti biliari e l'urobilina. Ecco gli altri dati raccolti durante la prima fase di queste osservazioni :

Data	Cavia	Peso gr.	Iniez. per ogni animale cc.	Colore	URINE Albumina	Emoglobina	Sedimento
27 II/1920	G1 B1	665 585	0.05	—	—	—	—
28 II/1920	G1 B1	620 581	0.05	—	—	—	—
29 II/1920	G1 B1	655 572	0.05	Giallo carico	Lievi tracce	Assente	Fosfati, epiteli ecc.
1 III/1920	G1 B1	649 558	0.05	»	»	»	—
2 III/1920	G1 B1	642 565	0.05	Marrone	Tracce	»	—
3 III/1920	G1 B1	638 559	0.05	Marrone verdastro	»	»	Crist. di ac. urico e fosfati.
4 III/1920	G1 B1	630 553	0.05	—	—	—	—
5 III/1920	G1 B1	650 565	0.05	Marrone scuro	Assente	Lievi tracce	Crist. di fosfato triplo, ossalato e carbonato di calcio.
6 III/1920	G1 B1	653 568	0.05	—	—	—	—
7 III/1920	G1 B1	630 553	0.05	Giallo paglierino	Forte inalbamento	Assente	Nulla di notevole.
8 III/1920	G1 B1	685 602	0.05	Marrone scuro	»	Tracce	»
9 III/1920	G1 B1	630 592	0.05	—	—	—	—
10 III/1920	G1 B1	638 587	0.05	Giallo marrone	Tracce	Assente	Qualche leucocita
11 III/1920	G1 B1	647 582	0.05	—	—	—	—

Dopo 14 iniezioni di un ventesimo di cc. al giorno non compaiono fatti degni di nota : le due cavie seguitano a mangiare d'appetito e consumano tutta la loro consueta razione alimentare, malgrado che abbiano avuto complessivamente gr. 0,84 di nitrobenzolo, e cioè gr. 1,26 ‰ di peso corporeo la G_1 e gr. 1,47 la B_1. Allora decidiamo di raddoppiare la quantità di nitrobenzolo : a cominciare dal 12 marzo si inietta ad ogni cavia un decimo di cc.

Data	Cavia	Peso gr.	Iniez. per ogni animale cc.	URINE Colore.	Album.	Hb	Sedim.	Osservazioni.
12/III/1920	G1 B1	672 574	0.1	Marrone chiaro	Lievi tracce	Assente	—	—
13/III/1920	G1 B1	679 556	0.1	—	—	—	—	—
14/III/1920	G1 B1	630 535	0.1	Giallo carico	Assente	»	Nulla di notevole	G1 leggera dispenea.
15/III/1920	G1 B1	545 555	0.1	Rosso verdastro scuro	Lievi tracce	»	»	G1 ha paresi agli arti posteriori, tremore e scosse toniche della testa. B1 ha l'arto posteriore sinistro quasi paralizzato
16/III1920	G1 B1	510 506	0.1	Giallo arancione	Lievi tracce	Presente	Cell. epit. rotondeggianti	Non hanno consumato l'intera razione. G1 paresi ed atassia del treno posteriore, contrazioni tonico-cloniche, respiro frequente difficile. B1 paresi degli arti posteriori dispnea.
17/III/1920	G1 B1	482 448	0.1	Rosso bruno	Assente	Tracce	—	Paresi manifesta degli arti posteriori. Respiro stentato: concorrono i muscoli accessori: inspirazione prolungata.
18/III/1920	—	—	—	—	—	—	—	Le due cavie si rinvengono morte.

In questa esperienza dunque il periodo di somministrazione del nitrobenzolo è stato di 20 giorni; e si è dato per i primi 14 giorni 1/20 di cc., per gli ultimi sei 1/10 per ogni cavia.

Necroscopie. — Cavia G_1 — Rigidità cadaverica abbastanza forte: appena incisa la pelle, si avverte il caratteristico odore di mandorle amare che si fa più marcato aprendo il sottocutaneo: anche i visceri odorano fortemente di nitrobenzolo.

Cuore. — Fermo in diastole con cavità fortemente dilatate.

Polmoni. — Piuttosto pallidi con piccole chiazze emorragiche sparse sottopleuriche, però galleggiano bene nell' acqua.

Stomaco. — Di apparenza normale se si eccettua un lieve stato iperemico della mucosa.

Intestini. — Medesimo reperto; forte iniezione dei vasi venosi, specie del tenue.

Fegato. — Piuttosto aumentato di volume, di colore rosso scuro con qualche sfumatura giallastra, cosparso di piccole chiazze chiare lucenti, di forma e grandezza varia, a contorno frastagliato, leggermente infossate, di cui quelle che si trovano in vicinanza della cisti fellea sono appena colorate in giallastro: il bordo epatico è molle, la cisti-fellea fortemente distesa lascia trasparire la bile di colore rosso rubino scuro.

Milza. — Leggermente aumentata di volume, di color feccia di vino piuttosto molle, succosa.

Reni. — Di consistenza e volume normali; si scapsulano bene; al taglio apparisce netta la distinzione fra corticale e midollare.

Vescica. — E' vuota e non offre nulla di patologico.

Cervello. — Lieve grado di iperemia.

Presi alcuni pezzi di questi organi, vengono fissati e colorati con emallume ed eosina dai quali si ottengono i seguenti reperti microscopici.

Miocardio. — I nuclei sono ben colorati: è visibile la striatura trasversa e quella longitudinale.

Polmoni. — Presentano zone in cui gli alveoli contengono emazie, epiteli desquamati, leucociti e qualche fagocita con pigmento ematico e sono separati da setti aumentati di spessore per dilatazione dei capillari. Alla periferia di queste zone invece gli alveoli sono dilatati, i setti schiacciati, ridotti ad un sottile strato epiteliale, e in qualche punto sono rotti.

Fegato. — Esistono piccole zone emorragiche; le vene sono assai dilatate. In molti punti intorno alla vena centrolobulare si ha una zona di degenerazione grassa, che abbiamo poi ritrovato anche negli animali avvelenati per via orale, e che ha un aspetto quasi stellare, con tendenza alla formazione del lobulo invertito. In qualche punto però c'è anche un po' di degenerazione periportale.

Milza. — Non presenta alterazioni anatomopatologiche degne di nota.

Rene. — Esistono emorragie nella sostanza corticale e più specialmente nei glomeruli; in alcuni tubuli secernenti e in qualche glomerulo esistono deposizioni di sali calcarei, espressione di patimento del rene.

Non riportiamo i protocolli dei dati necroscopici e microscopici riguardanti la cavia B_1 perché concordano perfettamente con quelli descritti sopra per la cavia G_1.

27a *Esperienza*.

Allo scopo di studiare se l' avvelenamento subacuto desse un quadro sintomatologico diverso da quello cronico abbiamo eseguito le seguenti esperienze. Due cavie una del peso di gr. 492, e l'altra di

gr. 405 vengono tenutè in osservazione nelle stesse condizioni delle due precedenti, e si inietta loro giornalmente 1/10 di cc. di nitrobenzolo (liquido C). La più piccola è morta in quattro giorni dopo aver ricevuto 4/10 di cc. di veleno pari a gr. 1.18 ‰ di p. c. ed ha presentato identica sintomatologia delle altre. La più grande è morta solamente dopo 10 giorni, quando cioè aveva ricevuto 1 cc. pari a gr. 2,65 di prodotto per ‰ di p. c. ma già fino dal 5° giorno era cominciato a comparire la solita sintomatologia. In questi due animali le urine non hanno mai presentato nulla di anormale. L'indagine anatomo-patologica macroscopica e microscopica ha dato reperti identici a quelli che ci hanno offerto le due cavie precedentemente studiate.

ESPERIENZE ATTE A STUDIARE LE EVENTUALI TRASFORMAZIONI CHE IL NITROBENZOLO SUBISCE NELLO ORGANISMO

La eventuale trasformazione che il nitrobenzolo subisce nell'organismo è problema ancora insoluto; Come già si è detto Olivier, Bergeron e Letheby pensano che il nitrobenzolo si trasformi in anilina e che agisca sull' organismo come tale : l'anilina si ritroverebbe nelle urine. Jaffe invece, pur pronunciandosi in maniera un po' evasiva, ritiene che tutta la sintomatologia dell' avvelenamento si debba all'acido fenico in cui questo prodotto si trasformerebbe. Allo scopo di portare qualche contributo personale alla risoluzione di questo lato del problema, abbiamo istituito le seguenti ricerche.

28a *Esperienza.*

Due conigli, uno del peso di gr. 1500 (A) ed un altro del peso di 1800 (B) vengono isolati e tenuti in osservazione per diversi giorni somministrando loro erba e crusca ad libitum. Le urine analizzate ogni giorno per assicurarsi che non contengono prodotti patologici, vengono conservate fino ad averne circa 2000 cc. del coniglio A e altrettante del coniglio B. Queste si portano in due capsule, e vengono evaporate fino al volume di poco più di 300 cc. A questo punto si acidificano con un po' di acido cloridrico, e si mettono in un pallone di litro, munito di un refrigerante a ricaduta : i due palloni si portano sopra un bagno maria contenente soluzione di cloruro di calcio, e si lasciano in ebollizione per sei ore onde assicurarsi che la idrolisi dei prodotti coniugati, eventualmente presenti, avvenga in modo completo. Indi, dopo raffreddamento, le urine vengono travasate in un imbuto separatore, e trattate a più riprese con cloroformio, le cui varie frazioni si portano in un palloncino, e se ne distilla la più gran parte. Il rimanente viene messo in una capsula di vetro, ed evaporato completamente su b. m. : il residuo dovrebbe contenere il fenolo, che talvolta si trova anche nelle urine di animali erbivori, mantenuti come i nostri in perfette condizioni fisiologiche. Tale residuo viene ripreso con alcuni cc.

di acqua distillata, si filtra, e sul filtrato si ricerca il fenolo, con la reazione del MILLON, e con l'altra del percloruro di ferro: si ha reperto negativo e con l'un reattivo e con l'altro: assicuratici per tal modo che i nostri conigli non eliminano fenolo con le orine, li sottoponiamo al seguente trattamento.

Coniglio A (16/VI/1920) Iniezione di 2/10 di cc. di prodotto C.
(17/VI/1920) » » » » »
(18/VI/1920) » » » » »
(19/VI/1920) » » » » »

L'animale, le cui urine analizzate quotidianamente hanno dato reperto negativo per i comuni prodotti patologici, è diminuito di circa 150 gr., senza però che sia comparso alcun sintomo di avvelenamento, per quanto abbia ricevuto 8/10 di cc. di nitrobenzolo. Decidiamo perciò di portare l'iniezione giornaliera a mezzo cc.

(21/VI/1920) Iniezione di 1/2 cc. di prodotto.
(22/VI/1920) » » » »

L'animale fino da stamani appare intontito ed ha poca voglia di mangiare: tre ore dopo l'iniezione comincia a presentare fenomeni di paresi a carico degli arti, ma i posteriori sono molto più colpiti degli anteriori: sbava abbondantemente, e ogni tanto digrigna i denti: messo fuori della gabbia sta fermo, ma se lo si stimola cammina barcollante e dà l'impressione di non vederci bene perché va spesso a battere il muso contro gli ostacoli che trova dinanzi.

Il 23 mattina l'animale è trovato morto: è sopravvissuto 7 giorni dal principio dell' avvelenamento dopo aver ricevuto 1,8 cc. di liquido C pari a gr. 1,33 per ‰ di p. c.

Le urine di questi otto giorni (880 cc.) sono state raccolte e concentrate fino a circa 180 cc. che dividiamo in due porzioni di 90 cc. cadauna. Sopra una porzione trattata nel modo già descritto si ricerca il fenolo, ma con esito negativo.

La seconda porzione di urina è sottoposta alle seguenti ricerche, con cui ci prefiggiamo di stabilire la eventuale presenza di anilina, la quale, come il fenolo, ha notoriamente delle reazioni tanto mai sensibili, che ne bastano tracce per poterla identificare; e col procedimento tenuto che descriviamo, non v' è dubbio che se anilina fosse stata nelle urine avrebbe dovuto scoprirsi senz' altro: nella bevuta contenente le urine verso soluzione di potassa caustica 10 % fino a reazione nettamente alcalina. in tal modo, se anche l'anilina fosse salificata con qualche acido minerale od organico; viene liberata da tale combinazione e resta la base libera: allora sottopongo a distillazione in corrente di vapore, che trascina seco l'anilina se c' é: il distillato si estrae ripetutamente con etere: delle varie porzioni di questo solvente riunite si distilla la maggior parte e i pochi cc. che restano si travasano in una capsula di vetro, e si evapora a b. m. Il residuo acquoso viene diviso in tre parti trattate nel modo che segue.

1°). Ad una porzione si aggiunge qualche goccia di ipoclorito al 5 % e non si forma quella colorazione bleu-violacea caratteristica dell' anilina trattata in questa maniera.

2°). Un' altra porzione di residuo viene trattata con qualche goccia di acido solforico concentrato, e con un po' di cromato di potassio polverizzato : non si forma la colorazione intensamente azzurra che avremmo avuto se anilina fosse stata presente.

3°). L'ultima parte del residuo viene scaldata moderatamente con soluzione alcoolica di potassa caustica e con qualche goccia di cloroformio, ma non si sviluppa affatto l'odore del fenilisonitrile.

Coniglio B. — Questo animale a datare dal 16/VI/1921 ha ricevuto giornalmente per quattro giorni 1/10 di cc. del liquido C, poi per due giorni ne ha ricevuti 2/10 al giorno : abbiamo quindi portato a 3/10 di cc. l' iniezione, ma non ne ha ricevute che una, perchè è morto nella nottata dal 23 al 24 giugno, anche esso dopo 7 giorni dall' inizio dell' avvelenamento, dopo avere ricevuto complessivamente cc. 1,1 di nitrobenzolo, pari a gr. 0,73 ‰ di p. c. I primi sintomi di avvelenamento sono comparsi quando nell' altro coniglio, ed hanno avuto le stesse caratteristiche e la stessa intensità : le urine conservate sempre normali durante il decorso dell' avvelenamento, trattate come le altre, per la ricerca del fenolo e della anilina, hanno dato costantemente lo stesso reperto negativo.

Il fegato dei due animali viene ridotto in poltiglia mediante un tritura-carne : ne vengono prelevate tre porzioni di 20 gr. cadauna : su due vengono fatte le ricerche dell' acido fenico e dell'anilina, seguendo gli stessi metodi che furono adottati per le medesine ricerche nelle urine : il reperto però è stato sempre negativo. La terza porzione viene trattata con 100 cc. di soluzione di acido solforico, e portata in un pallone munito di un refrigerante a ricadere : il pallone viene messo sopra un bagno maria contenente soluzione di cloruro di calcio, e si lascia bollire per due ore. Con questo procedimento ci prefiggevamo di scindere la eventuale combinazione che il nitrobenzolo avesse potuto contrarre con qualche acido nel fegato. Odorato il liquido dopo raffreddamento, questo non emanava affatto odore di nitrobenzolo ; ma nella supposizione che ve ne fossero tracce così minime da non essere rivelate dall' odorato abbiamo aggiunto al liquido ancora dell' acido solforico e della polvere di zinco, onde trasformare il nitrobenzolo in anilina : il pallone si è lasciato per qualche tempo su b. m., e dopo viene ripetutamente estratto con etere. Le varie porzioni di etere evaporate han dato un residuo sul quale sono state fatte tutte le reazioni dell' anilina, ma sempre con esito negativo.

Abbiamo quindi condotto la seguente esperienza allo scopo di controllare se non si elimini la sostanza come tale attraverso l'albero respiratorio.

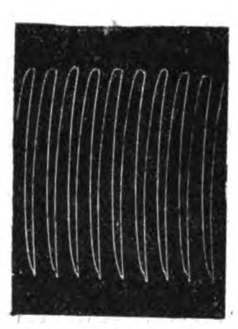
20a *Esperienza.*

Un coniglio del peso di gr. 1900 fissato su lettuccio operatorio viene tracheotomizzato e gli si applica un tubo a T che si mette in comunicazione con una coppia di valvole del MÜLLER, di cui quella attraversata dall' aria inspiratoria è ripiena di acqua, la seconda, attraversata dall' aria espiratoria, contiene del cloroformio, che dovrebbe trattenere il nitrobenzolo eventualmente eliminato attraverso la superficie respiratoria. Alle ore 11 all' animale viene iniettato 1/2 cc. di nitrobenzolo, alle ore 14 altro 1/2 cc. ; alle 15 il respiro diviene dispnoico ; alle 16 ed alle 16,1/2 altri due 1/2 cc. Poco dopo le 17 l'animale muore avendo ricevuto due cc. di nitrobenzolo. Incisa la pelle in corrispondenza del punto dove venivano praticate le iniezioni si trova gran parte del nitrobenzolo iniettato, che mediante una siringa riesco a ricuperare nella quantità di cc. 1,4. Dei 2 cc. iniettati solamente 6/10 non sono stati recuperati, e se si pensa che una buona frazione di questi sarà restata imbrigliata nel sottocutaneo si può ritenere che solo minime frazioni sono pervenute in circolo.

Travasato il cloroformio in una capsula tarata, ed evaporato a bagno maria, non solamente non ha lasciato nessun residuo apprezzabile, ma la capsula non odora nemmeno di nitrobenzolo, il che dimostra che almeno in questo caso l'animale ne ha assorbito così minime tracce, che è soggiaciuto all' azione del veleno prima dell' inizio dell'eliminazione per la via respiratoria.

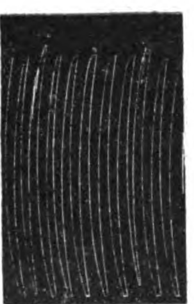
30a *Esperienza.*

Ad un coniglio di gr. 1350 di peso corporeo, viene messa allo scoperto la giugulare il cui moncone centrale si fa comunicare con una buretta contenente soluzione fisiologica satura di nitrobenzolo. Si lascia defluire il liquido con la velocità di un cc. ogni 80 minuti secondi : bastano queste tracce minime per provocare nell'animale uno stato disponico accompagnato da tremore e ogni tanto da scosse tonico-cloniche seguite da un periodo di rilasciamento muscolare. Dopo 15 minuti l'animale viene tracheotomizzato, e gli si applica una cannula a T, messa in comunicazione con un tamburino di Marey per registrare i movimenti respiratori (V. fig. a pag. 278). Siamo colpiti dal fatto che l'alito odora manifestamente di mandorle amare. La sintomatologia continua invariata e dopo circa mezz' ora, quando sono defluiti 18 cc. di liquido, si nota un certo torpore nella reazione delle pupille alla luce, né tale sintomatologia è molto variata un' ora e un quarto dall' inizio dell' esperienza, dopo che sono stati messi in circolo 50,2 cc. di soluzione satura : allora decidiamo di praticare un' iniezione endovenosa di nitrobenzolo puro a traverso la marginale dell' orecchio. Fatta l'iniezione di cc. 1,5, si vedono quasi subito scomparire i riflessi ; il respiro si fa difficile e raro per arrestarsi in fase espiratoria dopo quattro minuti primi, mentre il cuore seguita a pulsare ancora per altri quattro minuti primi.



Tracciato della respirazione normale.





Fasi successive delle modificazioni respiratorie durante la somministrazione endovenosa di soluzione acquosa satura di nitrobenzolo.

Dopo somministrazione endovenosa di cc. 1.5 di nitrobenzolo puro.



Ultimi movimenti cardiopneumonici.



Morte.



Tempo in secondi.

Azione del nitrobenzolo sulla respirazione (Tamburo di Marey).

Dalle ricerche chimico-biologiche precedentemente fatte ci sentiamo antorizzati ad affermare, che il nitrobenzolo non si trasforma né in anilina né in acido fenico : non possiamo con altrettanta sicurezza concludere che si elimina come tale, perché la ricerca del nitrobenzolo nel fegato è stata negativa, come negativo fu il resultato dell' eliminazione attraverso la superficie respiratoria nell' avvelenamento provocato mediante iniezione nel sottocutaneo (V. Esp. 28). Ma poiché invece nell' Esp. 29ª, in cui l'avvelenamento avvenne per via endovenosa, constatammo l'odore del nitrobenzolo nell' aria espirata, abbiamo qui un elemento di fatto per arguirne che probabilmente il nitrobenzolo agisce come tale. Dato il suo scarsissimo coefficente di solubilità ci par lecito supporre, che quella minima frazione che entra in circolo nell' avvelenamento per via orale e sottocutanea sia sufficente ad uccidere l'animale, ma non basti per esser rivelata nel fegato o nell' aria espirata.

Le richerche che istituiremo a suo tempo sul sangue, mireranno anche a far luce sopra l'esistenza o meno del nitrobenzolo in esso

CONTROLLO E CRITICA AL METODO DI ESTRAZIONE DEL NITROBENZOLO DAI VISCERI

Allo scopo di controllare anche il metodo di estrazione dagli organi, abbiamo iniziato una serie di ricerche , che ci hanno condotto a resultati veramente interessanti : infatti, come abbiamo detto sopra, il metodo generalmente consigliato è quello della distillazione dei visceri in corrente di vapore. il quale dovrebbe asportare la massima parte del nitrobenzolo. Ecco le prove in bianco che abbiamo fatto per controllare la esattezza del metodo.

31a *Esperienza.*

Preso un fegato di cavallo, ucciso da 12 ore, si è triturato finemente con un trituracarne : si predono tre campioni di poltiglia di 90 gr. ciascuno, ed ognuno si mescola intimamente con 10 gr. di nitrobenzolo, poi i miscugli si portano in tre palloni, che si lasciano a sé agitando di quando in quando: dopo 12 ore si sottopone la poltiglia di uno dei palloni a distillazione in corrente di vapore per due ore, e si conserva il distillato (A). Rispettivamente dopo 24 e dopo 36 ore si sottopongono a distillazione anche gli altri due palloni, raccogliendone i distillati B e C : anche in questi casi la distillazione è stata prolungata per due ore. I liquidi A, B, C, vengono portati a volume : parti aliquote si versano in un separatore, e vengono ripetutamente estratte con etere, di cui tutte le porzioni sono raccolte in una bevuta, poi sottoposte a distillazione : i residui vengono travasati in una capsula tarata, evaporati e portati a peso costante.

Dal distillato A si recupera l' 1.96 % di nitrobenzolo
» B » 1.61 % »
» C » 1.17 % »

questi resultati dimostrano all' evidenza che il metodo di distillazione in corrente di vapore non è affatto adatto ad una estrazione quantitativa del nitrobenzolo : infatti le poltiglie restate nei palloni odorano fortemente di nitrobenzolo ; le pesiamo tutte e tre e una parte aliquota di ognuna viene mescolata intimamente con sabbia lavata ed asciutta, e portata in un apparecchio del Soxhelet che lascio funzionare ad etere per due ore, in capo alle quali, l'etere dei tre Soxhelet viene raccolto, distillato ed evaporato in una capsula tarata fino a peso costante.

Dal campione A si recuperano gr. 7.82 di nitrobenzolo
» B » 7.95 »
» C » 8.25 »

cosicché sommando le quantità percentuali di nitrobenzolo ricavate per distillazione in corrente di vapore con quelle per distillazione della poltiglia con etere, si hanno i seguenti resultati :

Campione A 9.78 %
» B 9.56 %
» C 9.42 %

La difficoltà di estrarre il nitrobenzolo dai visceri col metodo della distillazione in corrente di vapore pensiamo che debba imputarsi sopra tutto al fatto che il vapore precipita le albumine dei visceri, formando una massa densa e compatta da cui poi è difficile al vapore stesso trascinar via il nitrobenzolo che ha un punto di ebullizione tanto elevato. Questo nostro modo di vedere è confortato dai resultati della seguente esperienza.

32a *Esperienza.*

Abbiamo sostituita alla poltiglia di fegato una sostanza organica priva di proteici, e si è scelto la salda d'amido al 5 %, di cui 90 parti abbiamo mescolato con 10 parti di nitrobenzolo, lasciando a sè per 12 ore agitando di quando in quando; poi si è distillata in corrente di vapore sottoponendo il distillato raccolto ad estrazione con etere in un imbuto separatore. In tal modo si è avuto dei resultati di gran lunga migliori che con la poltiglia di fegato, non arrivando però al rendimento quasi teorico che si ottiene col metodo di estrazione con etere in apparecchio del Soxhelet in miscuglio poltiglia di fegato-nitrobenzolo.

Infatti nelle precedenti esperienze i vari miscugli di fegato e sabbia, dopo il trattamento con etere in Soxhelet non odorano più affatto di nitrobenzolo e questa è la dimostrazione più evidente, che dell' essenza di mirbana non ne è rimasta affatto, perché anche minime tracce si sarebbero rivelate al loro odore acutissimo.

RIASSUNTO E COMMENTO DELLE OSSERVAZIONI SPERIMENTALI

Il quadro di azione fisiologica del nitrobenzolo resulta costituito da un intreccio di fenomeni, che, per lo meno in senso qualitativo, non variano col variare delle sostanze prese in esame, che rappresentano, come abbiamo visto, prodotti commerciali più o meno puri.

Ciò nonostante, quantitativamente è dato di osservare che l'equivalente di tossicità nei vari prodotti studiato, aumenta a mano a mano che cresce il nitrobenzolo in rapporto alle sostanze alle quali trovasi unito, e che rappresentano le impurezze : infatti noi abbiamo osservato che detto equivalente è massimo per il prodotto C (P. eb. 205-207°) e va diminuendo passando al prodotto D (P. eb. 209-211°) ed al prodotto E (P. eb. oltre 218°).

La natura e l'intensità dei fenomeni sopra accennati sono identici negli animali a sangue freddo ed in quelli a sangue caldo : i fenomeni caratteristici consistono in fenomeni di eccitazione e di depressione a carico del sistema nervoso centrale. Anche sperimentando con dosi estremamente piccole, mentre è possibile prolungare la durata dei primi, non si riesce mai ad evitare la comparsa dei secondi, i quali, al contrario, assumono decisa preponderanza allorchè si esperimenta con dosi più elevate.

I sintomi di eccitazione, che generalmente iniziano il quadro, non scompaiono, ma permangono tuttavia e talvolta assai evidenti anche a quadro fenomenologico inoltrato, cioè quando dominano la scena fatti di paralisi, con cui si giunge all' esito mortale.

I movimenti spontanei o intenzionali sono i primi a cessare ; i riflessi persistono più a lungo e particolarmente degno di rilievo ci sembra il permanere dei riflessi oculo-palpebrale e sopra tutto del l'acustico, che è l'ultimo a scomparire.

Anche quando l'animale non dà più segno di vita è dato di constatare che i nervi motori ed i muscoli dello scheletro si mostrano eccitabili allo stimolo elettrico in misura regolarmente abbastanza rilevante.

Nei mammiferi la morte avviene per paralisi del respiro, alla quale precede una fase netta di dispnea, di intensità e di frequenza notevole. A respiro cessato il cuore continua a battere per un certo tempo, e nel tracciato respiratorio è possibile rilevare piccole oscillazioni ritmiche sincrone coi battiti cardiaci.

Il quadro clinico umano (V. prima parte del lavoro) stando ai dati della letteratura e al caso dal quale sono state prese le mosse, presenta stretta somiglianza col quadro sperimentale sopra descritto, pur mostrandosi spiccata la prevalenza dei sintomi depressivi, i quali talvolta sono i soli che cadono sotto l'osservazione del medico, come ad es. nel caso del Prof. Coronedi : questo fatto deve molto verisimilmente stare in rapporto con la dose del veleno.

Per ciò che si riferisce alle alterazioni del sangue, che costituiscono uno dei punti più discussi nella tossicologia del nitrobenzolo, possiamo asserire che, sperimentalmente in vivo, non abbiamo nelle numerose ed accurate indagini eseguite, mai costatati i fatti che si trovano descritti a riguardo dell' avvelenamento umano, cioè, relativamente all' esame spettroscopico, non riuscimmo mai a veder comparire la stria di FILEHNE ritenuta caratteristica dell' intossicazione nitrobenzolica, la presenza di metaemoglobina non fu mai potuta constatare nei nostri animali da esperimento, mentre fu possibile rilevarla, benchè in tracce, nel sangue dell' individuo capitato all' osservazione del Prof. CORONEDI.

Circa il mancato reperto della metaemoglobina nel sangue degli animali occorre tener conto innanzi tutto, che il metodo spettroscopico è forzatamente un metodo limitato, e perciò potrebbe darsi che tale prodotto di trasformazione del pigmento ematico si fosse veramente verificato negli animali, ma in quantità così piccola da non essere dimostrabile : sta di fatto però che il resultato negativo delle ricerche, contrasta con quanto è noto sopra le proprietà metaemoglobinizzanti del nitrobenzolo. Per ispiegare queste contradizioni pare a me, che si possano avanzare varie ipotesi, che cioè :

a). Potrebbe darsi che l'emoglobina dei conigli fosse più resistente di quella dell' uomo agli agenti metaemoglobinizzanti. Ricerche al riguardo non ve ne sono, ma il fatto non può essere escluso a priori.

b). Potrebbe darsi che nel caso del Formigli avessero avuto influenza composti diversi mescolati al nitrobenzolo, che era un prodotto commerciale.

c). È noto che i batteri della putrefazione hanno pur essi un certo potere metaemoglobinizzante, onde è da presumersi che ad essi possa spettare una parte nella produzione della metaemoglobina.

Qualunque sia il valore che si possa dare a questa ipotesi non ci sentiamo in grado di emettere un giudizio definitivo nei riguardi del singolare comportamento del sangue da noi esaminato.

Naturalmente, come già più sopra è stato accennato, noi ci riserbiamo di ritornare sull' argomento intraprendendo speciali indagini ematologiche e chimico-fisiologiche, dirette quest' ultime all' analisi dei gas del sangue per verificare quanto è stato affermato a proposito dell' uomo da FILEHNE, secondo il quale l'ossigeno del sangue scenderebbe fin sotto l' 1 %.

BIBLIOGRAFIA.

1. — VILLAVECCHIA. — *Trattato di Chimica analitica applicata.* — *Hoepli, Milano,* 1917.

2. — MUCCIOLI. — *Tossicologia moderna.* — *Tipogr. Camera dei Deputati.* — *Roma* 1895.

3. — SCHILD. — *B. Klin. Wochenschr.* — 1895 n. 9, pag. 187.

4. — CHAPUIS. — *Précis de toxicologie.* — *Baillère, Paris* 1897.

5. — KOBERT. — *Lehrbuch der Intoxicationen.* — *Enke, Stuttgart* 1906.

6. — GRASSELLI e GIAROLI. — *Gazzetta degli Ospedali.* 1894.

7. — EWALD. — *Centralblatt für d. med. Wissensch.* 1873.

8. — VON MERING. — *Centrablatt für d. med. Wissensch,* 1875.

9. — JAFFE. — *Zeitschr. für physiol. Chemie.* — Bd. 2, 1879, 62.

10. — LETHEBY. — *Med. chirurg. Review,* 1863.

11. — OLIVIER et BERGERON. — *Journal de Physiologie,* 1863.

12. — GUTTMANN. — *Archiv für Anat. und Phys.,* 1866.

13. — FILEHNE. — *Archiv für exper. Pathologie und Pharmakologie.* Bd. 9 1879.

14. — JUDELL. — *Die Vergift. mit Nitrobenzol.* — Habilitationschrift. Erlangen 1876.

15. — ROLH. — *Uber akute und chronische Intoxicationen durch Nitrokorper.* — *Dissertation.* Rostock 1890.

FROM THE PHARMACOLOGICAL LABORATORY, JOHNS HOPKINS UNIVERSITY BALTIMORE, U. S. A.
DIRECTOR : PROFESSOR JOHN J. ABEL

PHARMACOLOGICAL EXAMINATION OF ISOPROPYL ALCOHOL

by

DAVID I. MACHT

Isopropyl alcohol is a colorless liquid with the specific gravity of 0.789, boiling point of 82-85° and melting point of minus 85°.8. It is freely soluble in water, alcohol and ether. This compound can be prepared synthetically in various ways. The chemistry of its preparation however is not the purpose of this paper. Of late years isopropyl alcohol has been obtained as a by-product in the refining of petroleum and this fact together with economical considerations has led to its introduction as a solvent in the arts in Germany and to some extent in this country. Among the articles for which it has been employed abroad are various cosmetics. Such a use of the drug rendered it interesting to inquire into its pharmacological and toxicological properties and in this paper the author proposes to report a few observations made by him on this subject.

Toxicity by Injection.

The author has published elsewhere figures concerning the lethal dosage of a number of alcohols when injected intravenously at regular intervals into anesthetized cats (1). In that communication it was shown that the toxicity of the various alcohols of the fatty acid series increases with the molecular weight. It was further shown, on comparing the lethal dosage of the normal propyl, butyl and amyl alcohols thus obtained, with the lethal dose of the isopropyl, isobutyl and isoamyl alcohols, that the secondary alcohols were comparatively less toxic than the normal ones. The lethal dose of a 5% solution of

(1) Jour. Pharmacol. & exper. Therap., 1920, XVI, 1.

normal propyl alcohol in physiological saline injected intravenously into cats was 40 cc. per kilo weight. The lethal dose of 5% isopropyl alcohol solution obtained in the same way was 50 cc. per kilo weight of cat. The lethal dose of normal propyl alcohol therefore, expressed in terms of the pure substance, was 2 cc. per kilo of cat while that of the isopropyl alcohol was 2 ½ cc. per kilo weight of cat.

Toxicity by Mouth.

A large series of experiments were performed on cats. It was found that the minimum lethal dose of isopropyl alcohol administered per stomach tube to cats under ether anesthesia was 6 cc. of the pure alcohol per kilo weight of cat.

Isopropyl alcohol was also administered repeatedly by mouth to a number of dogs. It was found that the administration of 2 cc. of isopropyl alcohol per kilo weight of dog by stomach tube even when repeatedly made on a number of successive days produced no visible deleterious results. The administration of 6 cc. of propyl alcohol per kilo weight produced a distinct narcotic effect, the animals were at first excited and then went off to sleep but recovered on the following day. Doses of over 6 cc. per kilo administered to a dog were sometimes found to be fatal, especially when the animals were first anesthetized with ether.

Absorption througth the Skin.

Inasmuch as isopropyl alcohol has been recommended abroad as an ingredient of various cosmetic preparations it was deemed desirable to inquire as to whether it could produce injurious effects by absorption through the skin. Experiments were made on rats and dogs and to a small extent on rabbits. Three dogs were carefully shaved so as to expose an area of skin about 4 centimeters square. This area was vigorously sponged or rubbed with isopropyl alcohol daily over a period of two weeks. No toxic or any other symptoms either of local or systemic character were noted. There was no interference with the growth of hair, nor was there any pain or irritation of the skin.

A number of white rats were also shaved in the back and isopropyl alcohol applied to the shaved area repeatedly. No toxic effects were noted. A much more heroic test for the absorption of isopropyl alcohol was then performed. A series of rats had the posterior half of the body dipped for a few seconds in a bath of isopropyl alcohol repeatedly for periods ranging from two to three weeks, care being taken that the drug did not get into the eyes or mouth. Practically all of the animals survived in this series of experiments. Absorption through the anus could not be excluded ; so that the results spoke in favor of the slow absorption, not only through the skin, but also through the mucous membranes of the anus.

Toxicity by Inhalation.

A number of rats were kept in a partially closed vessel and exposed to the vapors of isopropyl alcohol, which drug was kept in a small container in the same vessel. After a period of a week the rats were taken out and were apparently no worse for the experience.

Narcotic Effect of Isopropyl Alcohol by Inhalation.

This was investigated by studying the behavior of trained albino rats in the circular maze. This method of studying the narcotic action of drugs on the brain and neuro-muscular apparatus has been employed by the author in connection with a number of drugs (1) (2). The method is as follows: white rats are trained to find their way from the periphery of the maze to the center in the shortest period of time without committing any errors, a drug is then administered and the effect on the memory, discrimination and neuro-muscular coordination of the animals are noted. In the present instance rats were placed under a large funnel at the top of which was inserted a wad of cotton soaked with isopropyl alcohol. After a period of fifteen to thirty minutes the behavior of the animals was tested in the maze and it was found that in some of them a slight intoxication was produced. In cases where the animals licked the alcoholic sponge a marked intoxication was noted.

Narcotic Effect on Injection.

Experiments on rats in a maze were performed by injection the animal intraperitoneally with various doses of a 2 % solution of isopropyl alcohol. It was found that when the animals received about 40 milligrams of isopropyl alcohol per 100 gram weight that a distinct narcotic effect was produced as evidenced by a slower running time, a greater number of errors and the appearance of incoordination or ataxia in the hind legs. This narcotic dose of isopropyl alcohol was almost exactly one-half of the dose of ethyl alcohol required to produce the same effect. It will thus be seen that the narcotic power of isopropyl is much greater than that of ethyl alcohol.

Effect of Respiration and Circulation.

Isopropyl alcohol in common with other alcohols of the fatty acid series is a depressor of the medulla and death in acute intoxications

---

(1) MACHT and MORA: Jour. Pharm. & exper. Therap., 1920, XVI, 219.

(2) MACHT and BLOOM: Arch. Internat. d. Pharmacodynamie et Thér., 1920, XXV, 8.

with it is usually due to paralysis of the respiratory center. When one-half or even more of the lethal doses however were administered by mouth to dogs and cats the respiration was not found to be very much depressed.

Experiments on isolated frog's hearts showed that even weak solutions (1%) of isopropyl alcohol are poisonous for the heart muscle. This effect is also not an unexpected one but is produced by solutions of all alcohols of the series. The author has shown that the toxicity for isolated heart muscle, and also for smooth muscle from other organs, increases with the molecular weight but here again, the secondary alcohols were found to be comparatively less toxic than the corresponding normal alcohols.

Effect of Blood Pressure.

The author has performed a large number of experiments on cats and found that isopropyl alcohol when not given in lethal doses does not depress the blood pressure curve. Indeed this was found uniformly to maintain the blood pressure at a very high level, especially when compared with various chlorinated hypnotics. This fact rendered it especially useful in connection with its use as a general anesthetic for cats.

Anesthetic Effect on Cats.

The author has found that when isopropyl alcohol is administered to cats in doses of from 5 to 5 ½ cc. per kilo weight by stomach tube a very satisfactory general anesthesia is produced within a very short period of time. This anesthesia is of long duration, the animal remaining narcotized for periods from 12 to 24 hours and longer while the heart and the respiration are not much depressed. In using isopropyl alcohol as an anesthetic for cats the animal is first anesthetised with ether, a stomach tube is passed and the drug introduced with several times its volume of water. In order to obtain satisfactory anesthesia the stomach of the animal must be empty.

SUMMARY

The results of the above investigation lead the author to conclude that while isopropyl alcohol is more toxic than methyl and ethyl alcohols, it is less toxic than the normal propyl alcohol. Administration by mouth produces narcotic effects and when given in lager doses general anesthesia and finally coma with death. Very little of the drug is

absorbed by inhalation under ordinary conditions and no evidence has been found of the absorption of the drug through the skin. The drug was found to produce general anesthesia in cats and has been used as a laboratory anesthetic for cats by the author. While the drug is poisonous to the isolated heart muscle it is not very toxic to the heart and circulation in general in the intact animal unless given in very large doses. Death after fatal doses is due to paralysis of the respiratory center but when administered in smaller quantities even for general anesthesia the respiratory center is not excessively depressed.

ISTITUTO DI FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E TERAPIA
DELLA R. U. DI MESSINA,
DIRETTORE : PROF. G. VINCI.

Sull' avvelenamento per Carlina gummifera.
Nota III. — Ricerche farmacologiche sul Carlinato di potassio

per il

Dr. LUIGI TOCCO
aiuto

In precedenti note (1-2) no comunicato le mie osservazioni sugli avvelenamenti per Carlina g. nell' uomo e negli animali e le ricerche farmacologiche sul principio attivo — l'atractylato di K.

Si rendeva necessario estendere lo studio anche ad altre sostanze, e specialmente al Carlinato di K, riscontrate nella radice della Carlina g. per accrescere le nostre nozioni su questa pianta velenosa.

Questo è l'oggetto di questa breve nota.

COMPOSIZIONE DELLA RADICE.

La radice della C. g. contiene diverse sostanze alcune bene definite, altre ancora poco conosciute, ad onta che abili sperimentatori se ne siano occupati in diverse riprese.

Secondo LEFRANC, che studiò con molta cura questa radice nelle seconda metà del sec. XIX, essa conterrebbe :

1°) Inulina, nella proporzione allo stato fresco del 10 %, allo stato secco del 46,5 %. Essa per ebollizione prolungata si scinderebbe in parti uguali in levulosio ed in glucosio, e sarebbe, secondo TANRET (3), uguale a quella di dalia, di tapinanbour e di elegno.

2°) Circa 1,75 % di diversi principi zuccherini : glucosio, saccarosio, e un altro principio zuccherino cristallizzabile in prismi a facce obblique, inattivo, che fermenta e che riduce il liquido di Fehling, dopo aver subito l'azione di un acido diluito.

3°) Una essenza di odore viroso-narcotico, di densità 1030 a 18°, che bolle a 265° e a 308° si scinde e si resinifica. Quest'essenza, che la casa SCHIMMEL (6) da 100 Kg. di radice estrasse nella proporzione del 2 %, non è stata ancora studiata più largamente.

4°) Un lattice, abbondante al tempo della fruttificazione della CARLINA cioè nei mesi di luglio e agosto, che avrebbe una enorme importanza economica e industriale, se si potesse ricavare in grande quantità, dato il suo alto contenuto in caucciù di ottima qualità e molto elastico. TOCCO a CAGLIARI, ANGELICO a PALERMO lo ricavarono da questo lattice seguendo il metodo di HARRIES ed ottennero un prodotto puro, di colore leggermente giallo, dotato di grande elasticità e suscettibile di tutte le lavorazioni, alle quali si assoggetta industrialmente il caucciù.

WUNSCHENDORFF (4), spossando in SOXHLET per 24 ore la radice con etere di petrolio leggiero, ottenne il 3,95 % di un prodotto elastico essenzialmente costituito da caucciù solubile nell' etere di petrolio; che forma pseudo-soluzioni nel benzolo, nel cloroformio, nell' etere, nel tetracloruro di carbonio e nel solfuro di carbonio, insolubile nell'acqua e nell' alcool. Brucia con fiamma fuliginosa, che sprigiona odore tipico di caucciù; dà per distillazione secca un liquido bruno, puzzolento e oleoso e si lascia facilmente vulcanizzare.

5°) Cloruri alcalini e nel mese di maggio asparagina.

6°) Un sale solfo-acido di potassio, sinistrogiro, che da LEFRANC fu chiamato atractylato di potassio dal nome della pianta atractylis (gomma).

Questo sale tribasico, contenuto nella proporzione del ½ % è di natura glucosidica e bruciato lascia il 20,80 % di solfato potassico.

Scaldato a 100°, con un acido o con una base diluita, si scinde in acido solforico, acido valerianico e una sostanza complessa non ancora ben definita.

7°) Un altro sale di potassio, da LEFRANC chiamato Carlinato di potassio, che calcinato lascia un residuo di carbonato di potassio.

Nel 1918 WUNSCHENDORFF (4) preparò gli estratti di questa radice spossandolain SOXHLET per oltre 24 ore con etere anidro, cloroformio, alcool assoluto e acqua bollente. Dall' etere anidro ottenne 0,42 % d'un estratto giallo-oro, di odore balsamico, costituito da numerosi cristalli microscopici a stella, in parte solubile nel cloroformio. La parte insolubile, lavata con acqua e ripresa con etere, lascia depositare, per evaporazione lenta, bei cristalli aghiformi insolubili nell' alcool e nell' acqua. Quest' ultima però li trasforma in una massa molle di apparenza e consistenza gommosa.

L'estratto cloroformico, nella proporzione del 0,36 %, è amorfo, di odore viroso e di colore bruno giallastro.

Coll' alcool assoluto si ha un rendimento più elevato, circa l' 11,75 %. L'estratto è di colore bruno rossastro, in gran parte solubile nell' acqua, e precipita con l'acetato neutro di piombo. Tra un gran numero di sostanze WUSCHENDORFF ha potuto svelare anche un tannino e uno zucchero riduttore.

L'acqua bollente asporta circa gr. 22,50 % di sostanza estrattive.

Il liquido, dapprima limpido, di colore giallo ambra fortemente fluorescente, a contatto dell' aria rapidamente s'intorbida, abbrunisce e diventa nero. Per raffreddamento si depositano dei grossi cristalli d'inulina. Evaporando nel vuoto e riprendendo con alcool diluito si separa una sostanza gommosa che con altra evaporazione dà una nuova sostanza cristallizzata in begli aghetti, che WUNSCHENDORFF ritenne probabilmente identica all' atractylato di potassio di LEFRANC.

Incenerita la Carlina lascia gr. 14,88 % di cenere così costituita :

SiO^2	gr.	29,60 %
SO^3	»	8,86 %
Cl	»	4,57 %
P^2O^3	»	3,20 %
CaO	»	21,92 %
CO^2	»	8,80 %
Fe^2O^3	»	12,40 %
MnO	»	0,55 %
K^2O	»	8,15 %
Na^2O	»	1,10 %

CARLINATO DI POTASSIO.

Secondo LEFRANC (5) spossando la radice prima con alcool a 85° alla temperatura di 60°, dopo con lisciviazione con acqua distillata a freddo, si ottengono due soluzioni. Di esse la prima, l'alcoolica, contiene tutte le sostanze balsamiche, gli zuccheri, quasi tutte le sostanze coloranti, i cloruri alcalini e una buona parte dell' atractylato di potassio ; la seconda, l'acquosa, sostanze gommose colorate in bruno, qualche principio zuccherino, cloruri alcalini e un sale di potassio dell'acido carlinico « Carlinato di potassio ».

Questo sale bianco, inodoro, cristallizzato in piccoli aghi prismatici, di sapore, a differenza dell' atractylato di potassio, fresco e salato, che ricorda moltissimo quello del tartrato neutro di potassio, è alquanto deliquescente, contiene molta acqua di cristallizzazione, è molto solubile nell' acqua con reazione acida, solubile a caldo nell' alcool a 60°, poco nell' alcool concentrato. Bollito in alcool forte, i cristalli perdono la loro acqua di cristallizzazione, diventano opachi e fondono. Per raffreddamento dopo qualche ora cristallizza di nuovo, molto probabilmente, secondo LEFRANC, con un numero di molecole di acqua di cristallizzazione minore a quello che aveva cristallizzando dall' acqua. Abbastanza stabile al calore, scaldato con precauzione fonde nella sua acqua di cristallizzazione, che in seguito evapora senza crepitio.

Secco diventa opaco e aumentando ancora la temperatura fonde di nuovo, carbonizza e brucia spandendo un odore che ricorda la gelatina bruciata. Calcinato lascia un residuo di carbonato di potassio.

Dà col nitrato d'argento un precipitato bianco, insolubile in acido acetico, solubile per addizione di acido nitrico.

ACIDO CARLINICO. — Quest' acido si presenta come una sostanza solida, cristallizzata in aghi microscopici, che formano sulle pareti del recipiente una elegante arborizzazione di lucentezza di diamante. Esso è inodoro, di sapore acido, con un gusto acre particolare: è solubile nell' acqua, nell' alcool e nell' etere ordinario. Scaldato con precauzione si rigonfia, fonde e spande dei vapori bianchi soffocanti. Brucia senza lasciar residuo.

LEFRANC isolò quest' acido precipitando una soluzione concentrata di Carlinato di potassio con un eccesso di acido tartarico, filtrando e riprendendo il residuo con un eccesso di alcool. La soluzione alcoolica filtrata ed evaporata dà un acido impuro, che trattato con etere dà l'*acido carlinico* allo stato puro, il quale copre le pareti del recipiente con piccoli aghi arborizzanti.

RICERCHE PROPRIE.

PREPARAZIONE DEL CARLINATO DI POTASSIO. — Mi sono servito dei prodotti residuati dalla preparazione dell' atractylato di potassio per ottenere questo sale. I residui liquidi venivano portati a b. m a consistenza sciropposa per scacciare i resti di alcool, sciolti in acqua e filtrati a caldo, concentrati di nuovo a b. m. finchè il liquido s'intorbidava e abbandonati poi a sè stessi. Si formava dopo qualche tempo un precipitato cristallino, impuro per presenza d'una materia colorante gialla, che disciolto in acqua a caldo, chiarificato con carbone animale, purificato con una o due cristallizzazioni lavandolo con alcool forte, nel quale esso è poco solubile mentre è solubile la sostanza colorante gialla, dava un sale bianco, inodoro, cristallizzato in piccoli aghi prismatici, solubile nell' acqua con reazione acida nella proporzione del 2,5 %. Questo sale calcinato lascia un residuo di carbonato di potassio e trattato con nitrato d'argento dà un precipitato bianco insolubile in acido acetico, solubile per addizione di acido nitrico.

ESPERIENZE FARMACOLOGICHE. — Ho sperimentato su piccioni e conigli di piccola taglia, sia perchè questi animali sono molto sensibili all' atractylato di potassio, sia perchè non avevo a mia disposizione una quantità tale di prodotto da permettermi di sperimentare su animali di grossa taglia, somministrando la sostanza per via ipodermica in soluzione al 2,5 % in acqua distillata neutralizzata esattamente con soda a dose di cg. 30 — 40 — 50 per K., dose di molto superiore a quella tossico-mortale dell' atractylato di potassio. Gli animali non presentano alcun disturbo, se si eccettua una leggera dolorabilità nel sito dove è stata praticata l'iniezione e dove in seguito, circa 5 o 6 ore dopo, si nota una reazione infiammatoria ben circoscritta, caratterizzata da tumefazione, ipertermia locale, dolore, rossore ai bordi, mentre la cute della parte centrale si presenta piuttosto pallida. Questo processo infiammatorio diventa più intenso verso il 2° e il 3° giorno, si ha poi la formazione di un' escara necrotica nella parte centrale, che verso il 6° giorno cade.

Dalle superiori ricerche risulta che il carlinato di potassio è dotato solamente di una azione locale caustica.

La tossicità quindi della Carlina g. è dovuta esclusivamente all'atractylato di K.

—

BIBLIOGRAFIA.

1) L. Tocco. — Sull' avvelenamento per Carlina gummifera. *Riforma medica*, XXXVI, 1920, p. 742.

2) L. Tocco. — Sull' avvelenamento per Carlina gummifera.
Nota II. — Ricerche farmacologiche sul principio attivo della Carlina g. (Atractylato di K). *Arch. Intern. de Pharm. et de Therap.* XXVI, 1921.

3) M. C. Tanret.— Sur l'inuline d'Atractylis. *Journ. de Pharm. et de Chim.*, XXVIII, 1893, p. 57.

4) M. E. Wunschendorff. — La racine d'Atractylis gummifera. *Journ. de Pharm. et de Chim.*, XX, série III, 1918.

5) Lefranc. — Sur le « Carlinate de potasse et de l'acide carlinique » produits immédiats de l'Atractylis ou Carlina g. *Journ. de Pharm. et de Chim.*, X, série IV, 1869, p. 325.

6) Dal « Berichte » di Schimmel e C. – Essenza di Carlina acaulis. *Ann. di Chim. e Farm.* X, 1889, p. 166.

——

ISTITUTO FARMACOLOGICO DELLA REGIA UNIVERSITA' DI GENOVA.

Sulla cataforesi elettrica delle metallo-albumine ottenute per trattamento con polveri metalliche

nota di

A. BENEDICENTI
Direttore dell' Istituto Farmacologico di Genova.

S. REBELLO-ALVES
Direttore dell' Istituto Farmacologico di Lisbona.

Con una serie di lavori eseguiti da noi o da altri collaboratori e studiosi in questo laboratorio, ed in parte anche continuati nell' Istituto farmacologico di Lisbona, si sono dimostrati alcuni fatti che brevemente rendiamo noti ai lettori di questo importante periodico, anche per intelligenza del lavoro che viene qui ora pubblicato.

1° Sbattendo più o meno a lungo, ed anche solamente per pochi minuti, delle polveri di metalli puri, ridotti all' idrogeno, con soluzioni di ovo-albumina o con siero di sangue il metallo si fissa a queste sostanze proteiche, come si può rilevare a mezzo dell' analisi. (BENEDICENTI).

2° Sbattendo nelle stesse condizioni le polveri metalliche coll' acqua comune (abbenchè essa sia dotata di proprietà oligodinamiche e possa, rimanendo molto a lungo coi metalli scioglierne delle traccie), minime traccie di metallo vi si disciolgon che non è possibile rilevare coi metodi di indagini che sono oggi a nostra disposizione. (BENEDICENTI).

3° La coagulazione al calore delle albumine, così trattate coi metalli, scompare completamente od è di molto ritardata. Questo fenomeno varià a seconda dei diversi metalli coi quali l'albumina è stata trattata (CATTORETTI).

4° La fissazione del metallo non è dipendente dalla reazione più o meno alcalina della soluzione proteica e si manifesta anche nelle soluzioni albuminose private totalmente dei gas e dei sali che vi sono disciolti (BENEDICENTI — REBELLO).

5° Le albumine trattate con polveri metalliche assumono, a seconda del metallo, colori caratteristici diversi e divengono imputrescibili. Il metallo fissato non è dializzabile e non si svela che col

solfuro d'ammonio e non con altri reattivi chimici. Le sue proprietà ionomagnetiche sono pure scomparse (BENEDICENTI — REBELLO).

6° Sottoponendo le soluzioni metallo-albuminose a varie temperature, il loro colore e la loro viscosità si modificano notevolmente. Ciò è dovuto verosimilmente alla formazione, in queste condizioni, di nuovi complessi chimici (REBELLO).

7° Aggiungendo alle soluzioni proteiche, prima del loro trattamento colle polveri metalliche, una piccola quantità di rosso neutro è facile constatare che, dopo il trattamento con le polveri metalliche, la reazione delle soluzioni resta variamente modificata. Il trattamento con rame dà una maggiore acidità; il ferro modifica poco la reazione; il cobalto rende la soluzione albuminosa fortemente alcalina (BENEDICENTI-REBELLO).

8° Il cobalto è il metallo che si fissa più facilmente all' albumina. Il ferro, il rame, il nichel sono pure fissati in notevole quantità; lo sono meno l'alluminio, il mercurio, l'argento, lo zinco, il piombo, l'antimonio e lo stagno. L'oro e il platino non sono quasi fissati (BENEDICENTI-REBELLO).

9° L'esame ultra-microscopico dei liquidi metallo-albuminosi conduce ad escludere che il metallo si trovi nei medesimi allo stato di sospensione o di colloide a meno che non si tratti di colloide amicronico (ROCCI).

10° Come i metalli, così sono fissati dall' albumina anche taluni dei loro ossidi. Sono fissati in ordine decrescente, e per una agitazione di tre ore, il cobalto dall' ossidulo, il nichel dall' ossidulo e dall' ossido, il ferro dal sesquiossido, il rame dall' ossido, il manganese dal biossido. Invece il cobalto, che è il metallo più facilmente fissato, non lo è affatto allo stato di ossido e così pure non sono fissati dai rispettivi ossidi l'allume e lo stagno (ROCCI).

11° Sbattendo contemporaneamente due metalli diversi colle soluzioni albuminose, entrambi sono fissati ma in proporzioni diverse. Le soluzioni albuminose non sature per un determinato metallo possono fissarne un altro. Questo non accade trattando albumina satura o prossima alla saturazione per un dato metallo (ROCCI).

12° L'albume d'uovo, immobile, non sottoposto a manipolazioni di sorta alcuna e mantenuto a temperature prossime allo zero è capace di sciogliere e fissare rapidemente il metallo col quale sia posto in contatto anche se esso sia in grossi pezzi. Esiste adunque una vera attività chimica dell' albumina di fronte al metallo. Tutte le condizioni che favoriscono uno spostamento dell' equilibrio molecolare della sostanza proteica (agitazione, aumento di temperatura, autolisi, autoidrolisi) intensificano la proprietà che l'albumina ha di fissare i metalli. Nell' autolisi profonda, con conseguente formazione di composti chimici relativamente semplici (amido-acidi, ecc) la fissazione del metallo avviene in modo assai intenso, però affatto diverso da quanto avviene nell' albumina normale (ROCCI).

13° E' logico ammettere che la combinazione del metallo colla complessa molecola albuminoidea dia origine a una serie di complessi chimici metastabili. La facilità di formazione di questi complessi, chimici coi semplicissimi amino-acidi è provata dal fatto che trattando la polvere di un metallo con soluzione di glicocolla si possono separare quattro composti diversamente cristallizzati e diversamente colorati, dovuti alla combinazione di queste due sostanze (Rocci : ricerche tutt' ora inedite).

14° Le soluzioni albuminose trattate coi metalli sono dotate di un potere catalitico sull' acqua ossigenata. Il cobalto fissandosi all' albumina rende il suo potere catalitico cinque volte maggiore di quello della albumina semplicemente sbattuta con quarzo ; il nichel, il ferro, il rame non dimostrano chiaramente un potere eccitante ; il piombo e l'antimonio esercitano un' azione inibitrice sulla catalasi (Rebello-Benedicenti).

15° I sieri messi in contatto colle polveri metalliche o sbattuti modicamente con queste non assumono proprietà emolitiche eccetto per l' ossido di argento e un poco per l'argento metallico che inducono notevole emolisi. Se ad una soluzione emolitica di argento in cloruro sodico si aggiunge della albumina d'uovo si vede la soluzione emolitica perdere ogni attività e ciò per la formazione di un vero e proprio complesso chimico metallo-albuminoideo (Fedeli).

16° Il siero di sangue scaldato a temperatura anche bassa (30°-50°) si comporta, per quanto riguarda la fissazione dei metalli, diversamente dai sieri non riscaldati. E' cosi provato come queste basse temperature provochino profonde modificazioni chimiche nell' equilibrio molecolare del siero. In queste fenomeno si rilevano diverse fasi di fissazione a seconda delle diverse temperature (Fedeli : ricerche tutt'ora inedite).

17° Un' agitazione molto prolungata stacca il metallo dalla sua combinazione coll' albumina e lo rende dializzabile (Fedeli).

18° La quantità di ferro metallico trattenuta in vitro per sbattimento dal siero di sangue non è uguale per i sieri dei diversi animali. Il più attivo è il siero di maiale, meno attivo è il siero di coniglio ; vitello, montone; meno attivi ancora sono quelli di agnello e di bue (Zanda).

19° La ematossilina è un ottimo reattivo del rame-jone e dei complessi imperfetti del rame e può usarsi per ricercare questo metallo nei complessi albuminoidei. Trattando una soluzione contenente del rame, anche in piccolissime traccie con questo reattivo, si ottiene una bella colorazione bleu (Rebello).

20° Gli estratti di organi (fegato, muscolo, rene, cervello) ottenuti col torchio di Büchner e sbattuti colle polveri metalliche (cobalto e rame) fissano questi metalli in proporzioni diverse ; più l'estratto di fegato meno quello di muscolo, ancor meno il rene; nulla, o quasi nulla, fissa l'estratto di cervello. Le proteine dei vari organi isolati si comportano alla stessa maniera.

E' lecito affermare che la distribuzione dei metalli nell' organismo e la loro prevalente fissazione nel tessuto epatico e muscolare sia dovuta, in parte almeno, alle proprietà delle sostanze chimiche che compongono questi organi (BENEDICENTI-REBELLO).

21° La fissazione del metallo all' albumina non modifica profondamente le proprietà biologiche dell' albumina stessa, usata come antigeno. Le singole metallo-albumine, iniettate agli animali, non danno sieri specifici per le medesime, ma solo per l'albumina naturale (REBELLO).

22° La tossicità delle metallo-albumine sperimentata sugli infusori e sulle anguillule dell' aceto, mentre si mostra piccola per talune di esse è molto notevole per altre (cobalto e rame) (ARIOLA).

23° Introducendo le polveri metalliche sottocute alle rane si manifestano fenomeni di intossicazione che confermano le esperienze *in vitro*. Mentre la polvere di cobalto uccide l'animale in meno di 24 ore, l'ossido di questo metallo si presenta del tutto innocuo. Fenomeni analoghi si verificano colla polvere di altri metalli e degli ossidi corrispondenti (ARIOLA).

24° I metalli polverizzati che agiscono così notevolmente sul complesso albuminoideo non alterano quella parte dell' albumina che è capace di agire e reagire sull' organismo in modo da determinare il fenomeno dell' anafilassi (ZANDA).

25° I topi bianchi che hanno ricevuto una o più iniezioni di soluzioni di albumina normale e di soluzioni d'albumina unita ai metalli (cobalto, ferro, rame) sopportano molto bene iniezioni successive di albumina-ferro e di albumina-rame a dose mortali per un fenomeno analogo a quello osservato dal RICHET nei cani anafilassati (ZANDA).

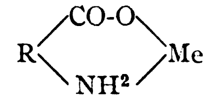
Dopo avere dimostrato quanto sopra si è riferito ci parve interessante ricercare ancora come si comportasse il metallo fissato all' albumina allorquando la soluzione metallo-albuminoidea viene sottoposta al passaggio della corrente elettrica.

Per sottoporre detta soluzione metallo albuminoidea alla corrente ci siamo alcune volte serviti dell' apparecchio di BECHHOLD. In due vasi si introduce la soluzione da sperimentare e la comunicazione tra i due recipienti si fà a mezzo di un tubo ad U ripieno pure di liquido. Il liquido contenuto in questo tubo comunicante può essere separato da quello contenuto nei vasi, allorquando alle sue due estremità, svasate in guisa di campanelle, si applichino delle membrane dializzatrici o d' altra natura. Due elettrodi, in platino platinato, collocati uno in un vaso e l'altro nell' altro permettono il passaggio della corrente.

Che cosa accade allorquando la corrente elettrica attraversa un colloide organico come è l'ovo-albumina? HARDY ha sperimentato, per risolvere questo problema, su albumina d' uovo coagulata e poscia, con una piccola quantità di alcali, ridisciolta. Questo liquido, collocato in un tubo ad U, e fatto traversare dalla corrente avrebbe presentato un

coagulo opaco, bianco all' anode mentre, adoperando albumina acida, le particelle andrebbero, colla corrente positiva, al catode. Se la soluzione albuminosa è assolutamente neutra non si manifesta alcun trasporto. Quindi si deve concludere che le particelle di albumina alcaline si caricano negativemente e quelle acide, positivamente, rispetto all' acqua. Se il liquido è neutro si ha una minima diffirenza di potenziale fra l' acqua e le particelle, ed entrambe formano una massa elettrica omogenea. W. PAULI ha completato queste esperienze facendo passare la corrente elettrica (per tre-quarantotto ore) traverso tre vasi fra loro riuniti con tubi ad U. Prelevati i campioni dai tre vasi e determinate col metodo di Kjeldhal le modificazioni che avvengono nel contenuto albuminoideo, egli pure riscontrò che una albumina perfettamente priva di elettroliti non presenta alcuna cataforesi, mentre gli acidi, e i sali acidi caricano le particelle albuminose positivamente e gli alcali impartono loro una carica negativa.

Nelle nostre esperienze noi non abbiamo adoperato soluzióni di ovo-albumina prive di elettroliti, ma, come già altri autori hanno fatto, per metterci in condizione più possibilmente, uguali a quelle che si verificano nei tessuti dell' organismo animale, ci siamo serviti di albume d' uovo sciolto nell' acqua distillata e quindi filtrato per separarne le globuline e le altre sostanze precipitabili. Qui il fenomeno evidentemente si complica per la presenza dei numerosi elettroliti che si trovano nella soluzione e che possono essere dati sia dai sali contenuti nell' albumina stessa sia dal metallo che è stato trattenuto dalle soluzioni albuminose. Se questo metallo si trovasse semplicemente allo stato di idrosol nella soluzione, il suo destino sarebbe diverso secondo i diversi metalli. L' argento colloidale, l' oro, il platino, il solfo migrano all' anode. L'idrossido di ferro ed alluminio migrano al catode. Ma come è dimostrato, da tutto quanto si è sopra riferito, il metallo non trovasi semplicemente disciolto, ma allo stato di combinazione chimica colla molecola albuminoidea e, aggiungiano, in forma di un complesso chimico. H. LEY ha creduto di potere esprimere la combinazione di un aminoacido con un idrossido metallico colla formula



Ma il problema resta così troppo semplificato. E basta riflettere alle esperienze del ROCCI già sopra riferite dalle quali risulta che trattando una soluzione di glicocolla con polveri di cobalto si ottengono tre composti chimici diversamente cristallizzati e colorati. Che cosa non accadrà, ci domandiamo, colla molecola albuminoidea così complessa? Se quindi, per semplificare il problema, si può ammettere con PAULI e FLECKNER che *mutatis mutandis* le proteine si comportino con i sali metallici nel modo istesso di un aminoacido, bisogna pur tuttavia pensare che in realtà le cose non sono così semplici ed è pure logico

ammettere che si formi non un solo complesso chimico ma che se ne formino diversi e *metastabili*, a seconda delle condizioni in cui la proteina si trova. Ammesso intanto che sia possibile l'esistenza di un albume-jone e che questo possa combinarsi coi sali neutri, nulla impedisce di pensare che si addivenga in questo caso alla formazione di complessi neutri, probabilmente con chiusura di un anello, così come è rappresentato dallo schema seguente di PAULI e FLECKNER

$$\mathrm{Me\ S} + \mathrm{R}\begin{cases}\mathrm{NH^2}\begin{cases}\mathrm{H}\\ \mathrm{OH}\end{cases}\\ \mathrm{CO\text{-}OH}\end{cases} \rightleftarrows \mathrm{R}\begin{cases}\mathrm{NH^2\text{-}HS}\\ \mathrm{CO\text{-}O\text{-}Me}\end{cases} + \mathrm{H^2\ O.}$$

Ora questo complesso può ionizzarsi al passaggio della corrente e noi potremo ammettere che si formi un jone acido del tipo

$$\mathrm{R}\begin{cases}\mathrm{NH\text{-}Me}\\ \mathrm{CO\text{-}OH}\end{cases}$$

e un jone alcalino del tipo

$$\mathrm{R}\begin{cases}\mathrm{NH^2}\\ \mathrm{CO\text{-}O\text{-}Me}\end{cases}$$

Il primo sarebbe dotato di una carica positiva e migrerebbe al polo negativo, il secondo avrebbe una carica negativa e sarebbe trasportato al polo positivo. Tuttociò nel caso in cui nella soluzione non esista che un complesso metallo-albuminoideo neutro e allo stato di purezza e in esclusione di ogni altro elettrolito. Ma questo non è il caso nostro poichè qui esistono nella soluzione molti altri elettroliti. Questi o formano parte integrante della molecola albuminoidea o si trovano come joni nella soluzione ed in questo ultimo caso essi potranno essere adsorbiti dalle particelle albuminoidi che migrano ad un polo e all' altro e ciò seconda la natura dell' elettrolito che loro aderisce. Basteranno questi fatti per dimostrare al lettore come questi fenomeni siano complicati. Tuttavia l'esame dei fatti da noi rilevati potrà portare un pò di luce su questi problemi.

ESPERIENZA I. — Soluzione di ovo-albumina diluita, sbattuta per tre ore col rame ridotto all' idrogeno (per i particolari si rimanda ai ricordati lavori). Il liquido dopo la sbattimento ha assunto un colore giallo verdognolo. Viene centrifugato lungamente e vi si aggiunge cloruro sodico nella proporzione dell' 8 $^{0}/_{00}$ per facilitare il passaggio della corrente. Il liquido introdotto nell' apparecchio di BECHHOLD è sottoposto al passaggio della corrente di *due* volts, per 24 ore. Al fine dell'esperienza si trova al *polo positivo* la soluzione fortemente acida, torbida, con coaguli bianchi e notasi sviluppo di cloro. Sull' elettrodo forte coagulo aderente di albumina, di colore giallo verde. Al *polo negativo* la soluzione è fortemente alcalina, limpidissima di colorito

roseo violaceo e nessun coagulo trovasi all'elettrodo. L'albumina dell' anodo viene tolta e disciolta in soluzione lievemente ammoniacale. Per aggiunta di soluzione diluita di acido acetico o di soluzione debole di NaOH vengono i liquidi ridotti alla stessa [H˙] in prezenza di rosso neutro, come indicatore. Praticata la ricerca del rame coll' ematossilina si trovano nel liquido del catode traccie dubbie di rame ; nulla nel liquido dell' anode, mentre si ha forte reazione di rame nel coagulo albuminoso aderente all'anode. Provando la presenza del rame coll' H^2S, come reattivo, si hanno dubbie traccie nel liquido del catode ; niente all' anode. Reazione netta nel coagulo albumoideo. Da questa esperienza si può concludere che la maggior parte del metallo si trova al polo positivo ed è trattenuta dall' acido albumina coagulata al detto polo. Possiamo per prima cosa domandarci se questo metallo sia veramente fissato al coagulo albuminoideo ovvero se per un fenomeno di adsorbimento la soluzione ricca di rame imbeva il coagulo albuminoideo. L'esperienza seguente cerca di chiarire questo punto del problema.

ESPERIENZA II. — Siero di sangue di manzo sbattuto per 3 ore con rame ridotto. Il liquido assume colore verde bluastro. Notevole precipitato di albumina di colore grigiastro al fondo del tubo, precipitato che si separa con prolungata centrifugazione. Il liquido è messo nel solito apparecchio, per 22 ore, crescendo gradatamente il voltaggio da ½ volts fino a 4 ½ volts. Per molto tempo la reazione, leggermente alcalina della soluzione albuminoidea si mantiene inalterata senza sviluppo di gas ; la lamina del catode va lentamente coprendosi di rame. Al giorno seguente, dopo 22 ore di passaggio della corrente, la reazione del liquido è leggermente acida all' anode ed è leggermente alcalina al catode. Il liquido della vasca catodica è trasparente, bruno, dicroico; quello della vasca anodica è torbido per formazione di un precipitato, verdastro alla trasparenza e bleu alla riflessione. Dopo centrifugazione il precipitato viene lavato; e separato dal liquido anodico rimanente. Tutti i liquidi vengono ridotti alla stessa concentrazione idrogenionica per aggiunta di idrato sodico o acido acetico. Ricercando il rame coll' ematossilina, si trova, nel liquido della vasca del *polo negativo*, sensibile reazione del metallo ; in quello del *polo positivo* reazione notevoluente più forte ; nel precipitato albumoideo che era aderente all' elettrodo e che è stato ridisciolto si ha appena sensibile la reazione del metallo, mentre abbondantissimo si trova nelle acque di lavaggio del precipitato. Da quest' esperienza si potrebbe dedurre che il precipitato albuminoideo al polo positivo contiene molto metallo, ma poichè questo può facilmente essere separato per lavaggio dall' albumina che lo tratteneva convien concludere che esso si sia staccato della sua combinazione coll' albumina e che, come un metalle colloidale abbia migrato all' anode.

ESPERIENZA III. — Ovo-albumina preparata sciogeliendo due albumi in 200 cm³ circa di acqua distillata *senza* aggiunta di cloruro sodico. Lo sbattimento col rame dura 4 ore circa. La soluzione è limpida, gialla e viene centrifugata e messa nell' apparecchio alle ore 5 di sera con una corrente di 15 volts. Dopo 18 ore si nota leggera reazione acida nel liquido della vasca anodica con lieve precipitato di albumina.

Il liquido della vasca catodica è leggermente alcalino. Sugli elettrodi di platino non si riscontra deposizione di metallo. Le prove all' ematossilina, fatte su campioni dei vari liquidi ridotti ad uguale concentrazione idrogenionica, danno i seguenti risultati. Il liquido della vasca anodica assume il caretteristico colore bleu che indica notevole presenza di rame : il liquido della vasca catodica presenta invece un colore rosso bordeaux. Un campione di controllo di metallo albumina, non sottoposta alla corrente e trattato con ematossilina, si colora intensamente in bleu.

Si lascia passare la corrente, a 50 volts, per altre 24 ore. Il liquido della vasca negativa diventa poco alla volta roseo poi violaceo mantenendosi trasparente e abbastanza alcalino. E' evidente che il rame inpresenza deglie OH-joni e dell' albumina dà *origine alla reazione del biureto*. Il liquido della vasca positiva diventato limpido, malgrado la sua acidità, è perfettamente incoloro. L'elettrodo positivo pare non

contenga traccia di metallo sulla sua superficie; il negativo ha assunto un lieve colorito grigiastro. Le reazioni all' ematossilina, praticate colle solite cure, dimostrano un' intenso colore bleu nel liquido del vaso positivo, mentre il liquido del vaso negativo si colora molto più lievemente. Trattando i liquidi anche con idrogeno solforato troviamo che quello della vasca catodica si dimostra meno ricco di rame di quello della vasca anodica. Gli elettrodi di platino, lavati coll' acido nitrico caldo, dimostrano al catode una piccola quantità di rame mentre nulla se ne trova all' anode. Bisogna adunque ammettere che il metallo esista sotto due forme diverse : nell' una si comporta come taluni metalli colloidali e, come abbiamo veduto, migra all' anode: nell' altra si comporta come il metallo di un sale ionizzabile che si porta al polo negativo Ma il fatto più importante a notarsi in questa esperienza è la formazione di una membrana albuminoidea nel tubo ad U di congiunzione fra i due vasi e precisamente all' estremità del ramo pescante nella vasca positiva. Questa membrana ottura completamente il tubo e una notevole quantità di metallo vi è sopra depositato, come lo dimostra il colore verde di detta membrana e come lo prova l'analisi chimica. Si impone quindi subito il problema se la formazione di questa membrana albuminoidea, molto differente dal semplice opacamento notato dall' Hardy sia effetto del passaggio della corrente o se essa sia dovuta semplicemente alla differente reazione dei liquidi contenuti nei due vasi. Le esperienze seguenti riguardano questo problema.

Esperienza IV. — Abbiamo messo un miscuglio di cobalto e rame-albumina in due vasetti ed abbiamo stabilito la comunicazione con un tubo di vetro piegato ad U. Coll' acido cloridrico e coll' idrato sodico abbiamo cambiata la concentrazione idrogenionica delle vaschette fino a netta reazione (acida nell' una, alcalina nell' altra) al tornasole. Dopo molte ore si formò un' intorbidamento ed una coalgulazione nella parte intermedia del tubo senza mai arrivare alla formazione di un diaframma, nè alla deposizione di composti colorati del metallo. Finito l'esperimento si lascia passare una corrente elettrica di 15 volts per alcune ore e si nota formazione di un coagulo otturatore con deposizione di composti colorati. Sembrerebbe dai dati di questa esperienza che per ottenere la formazione del diaframma sia necessario, in parte almeno il passaggio della corrente. Per quanto riguarda la reazione dei liquidi e il punto preciso di formazione della membrana ci può dare qualche lume l'esperienza seguente.

Esperienza V. — Una soluzione di ovo-albumina sbattuta con cobalto è collocata nell' apparecchio solito, dopo aver aggiunte alcune goccie di rosso neutro. L'albumina ha assunto un lieve colorito roseo. Si fà passare una corrente elettrica di 50 volts per 24 ore. All' estremità del ramo pescante nel vaso positivo si è formata una membrana albuminoidea che ottura il tubo : essa è colorita in bruno. Questa membrana separa esattamente i due liquidi di reazione diversa. Infatti mentre il liquido del vaso positivo, nonchè tutto il tubo ad U fino alla membrana è, di colorito rosso (acido) il liquido della vasca negativa fino al punto di separazione costituito dalla membrana è giallo (alcalino). Moltissime volte abbiamo ripetuto questa esperienza variandola anche in modi diversi ed adoperando vari metalli e sempre si è avuto lo stesso risultato. *E' quindi lecito concludere che la membrana formata dall' albumina coagulata è sempre ed esattamente situata nel punto neutro dove trovasi l'optimun di flocculazione.*

Giunti a questo punto per seguire meglio l'andamento del fenomeno ci è parso utile di poter fare contemporaneamente esatte ricerche di confronto, sperimentando-su varie metallo albumine e paragonandole con albumina nativa e con albumina che fosse stata sbattuta semplicemente con quarzo. Per raggiungere questo scopo abbiamo costruito un apparecchio costituito da quattro coppie o sistemi di vasi che possono funzionare contemporaneamente e colla stessa corrente. I vasi hanno tutti le stesse dimensioni (capacita 30 cm^3) e la corrente è trasmessa da elettrodi di platino tutti uguali, rettangolari (mm. 20 × 14). Ecco i risultati di alcune esperienze.

ESPERIENZA VI. — Soluzione di ovo-albumina. Nel primo sistema si colloca dell' albumina nativa; nel secondo: albumina sbattuta con quarzo; nel terzo: albumina trattata per cinque ore con cobalto ridotto; nel quarto sistema: albumina trattata con rame. Messi immediatamente sotto l'influenza della stessa corrente (20 volts) si è visto lieve sviluppo gasoso nel sistema contenente l'albumina nativa e in quella sbattuta col quarzo; molto minore sviluppo nei sistemi continenti le albumine-metallo. La corrente ha durato dalle ore 19 alle ore 10 del giorno seguente. I risultati delle esperienze si possono riassumere nel modo seguente:

Albumina nativa — liquido della vasca positiva: acido e limpido; liquido della vasca negativa: alcalino, pure limpido. In nessuno dei due, osservasi precipitato.

Albumina-quarzo — liquido della vasca positiva: lievemente torbido ed acido; liquido della vasca negativa: alcalino, limpido, incolore.

Albumina-cobalto — liquido della vasca positiva: acido con fortissimo precipitato brunastro in prossimità del tubo comunicante da dove pende a guisa di una stalattite; liquido della vasca negativa: alcalino, lievemente bruno e trasparente.

Albumina-rame — liquido della vasca positiva: acido, con fortissimo precipitato; nel tubo comunicante notasi un diaframma di albumina coagulata che separa il liquido viola (biureto) dal liquido rimanente.

Il diaframma è in prossimità del vaso positivo e la superficie *che guarda verso il liquido alcalino* è verde. Il liquido della vasca negativa è trasparente, alcalino, limpido e colorito in viola.

Dopo avere ridotti tutti i liquidi alla stessa concentrazione idrogenionica, in presenza di rosso neutro, mentre l'albumina nativa e quella sbattuta con quarzo non danno, come è naturale la reazione caratteristica del rame, nel sistema dell' albumina-rame notasi invece nel liquido della vasca positiva un' intenso colore bleu. mentre meno intenso assai è il colore che si ottiene trattando il liquido della vasca negativa. Col solfuro d'ammonio nel sistema cobalto-albumina si ha forte reazione nel liquido della vasca positiva e più debole in quello della vasca negativa. Gli stessi risultati si hanno nel sistema della albumina-rame. Le membrane dei tubi comunicanti separate e disciolte danno fortissima la reazionne del cobalto e del rame. Il precipitato del vaso positivo del sistema cobalto-albumina, dopo numerosi lavaggi con acqua distillata, solubilizzato con debole soluzione di soda, non lascia rilevare traccie di cobalto. Sull' elettrode positivo del sistema rame si ha debolissima reazione; più forte si ha nei liquidi di lavaggio dell' eletrode negativo.

Nel sistema cobalto la ricerca del metallo sull' elettrode positivo non lascia rilevare traccie di metallo, mentre si ha evidente reazione nel liquido di lavaggio dell' elettrode negativo.

Da queste esperienze resta confermato:

1° Che il metallo si trova sempre in maggiore quantità nel liquido del polo positivo che non nel liquido del polo negativo.

2° Cle l'elettrodo negativo contiene sempre sulla sua superficie un pò di metallo depositato.

3° Che la maggior parte del metallo è depositato sulla membrana che separa la soluzione acida dalla soluzione alcalina, cioè nel punto isoelettrico e che detto metallo trovasi sempre deposto sulla superficie della membrana rivolta verso il liquido alcalino.

4° Che il metallo che trovasi in prevalenza al polo positivo è fissato in gran parte dal coagulo albuminoideo, ma che la fissazione pare sia da considerarsi come una semplice forma di adsorbimento. Ora il trasporto del metallo dal polo negativo al positivo può avvenire in due modi: o perchè l'albumina-metallo si ionizzi nel mezzo alcalino, ricco

di OH-Joni, e le particelle cariche negativamente si trasportino al polo positivo trascinando con sè il metallo combinato, che poi si staccherebbe in un mezzo acido; ovvero perché, come già si è detto, il metallo si stacchi subito fin da quando si trova nel mezzo alcalino, dalla sua combinazione albuminoidea e dopo aveva assunto lo stato colloidale si porti in tale forma all' anode. Non v' ha dubbio che nelle nostre esperienze noi dobbiamo avere due correnti contrarie ed opposte di particelle albuminoidee le une cariche positivamente che si recano al catode le altre elettro-negative che migrano all' anode. Là dove queste particelle si equilibrano; là dove le cariche si neutralizzano; là dove la massa elettrica diviene omogenea avviene la flocculazione e la formazione della membrana.

Quale di queste due correnti predomina? La maggiore quantità di metallo riscontrata al polo positivo farebbe pensare che più vivo possa essere il trasporto di ioni albuminoidei elettro negativi verso il polo positivo. Per chiarire questo punto cioè se esista veramente un trasporto di albumina al polo positivo, noi abbiamo sottoposto al passaggio della corrente delle soluzioni di cobalto, ram e ferro-albumina per parecchie ore e dopo abbiamo determinato il residuo solido evaporando i liquidi contenuti nelle vasche positive e negative. Operando in questo modo si nota che, per effetto della corrente, si ha un trasporto di albumina al polo positivo, poiché mentre il residuo secco del vaso negativo é di 33,5 %, quello del vaso positivo è di 66,5 %. Nel sistema cobalto abbiamo nel vaso negativo un residuo di 41,5 % e nel positivo di 58,5 %. Nel sistema ferro abbiamo nel vaso negativo un residuo secco di 42 % e nel positivo un residuo secco di 58 %. La differenza dunque tra l'albumina contenuta al polo positivo e quella contenuta al polo negativo è nel sistema albumina-normale uguale a 33 in più al positivo, nel sistema cobalto 17 in più al positivo, nel sistema ferro è uguale a 16. Pur non essendo queste esperienze esenti da gravi errori dovuti al trasporto anche di elettroliti contenuti nella soluzione albuminoidea pure dimostrano in modo sicuro i due fatti seguenti.

1° Che passando la corrente elettrica in una soluzione di ovo-albumina naturale si haun prevalente trasporto di joni albuminoidei elettro negativi al polo positivo.

2° Che nelle albumine-metallo questo trasporto è apparentemente in parte ostacolato; e diciamo apparentemente, ricordando che una gran parte della albumina va impiegata a formare la membrana otturatrice che separa i due liquidi di reazione diversa e che si forma nel punto isoelettrico della soluzione.

Per cercare di chiarire intanto come il metallo migri sotto l'azione dalla corrente abbiamo eseguite le esperienze seguenti:

ESPERIENZA VII. — Si prepara l'apparecchio del BECHHOLD colle aperture delle due campanelle del tubo ad U chiuse da carta pergamena. Nel tubo ad U così preparato si introduce dell' albumina-cobalto, poi nei due vasi positivi e negativi si versa dell' acqua distillata, indi si fà passare la corrente stradale (circa 110 volts) per 36 ore.

Risultato: liquido della vasca positiva acido al tornasole, incolore. Liquido della vasca negativa alcalino, bruno debolmente.

Liquido della campana del dializzattore, pescante nella vasca positiva, acido, limpido.

Liquido della campana pescante nella vasca negativa ugualmente acido, torbido con un coagulo bruno fioccoso depositato sulla parete interna della membrana. *E' adunque la membrana della campanella che chiude l'estremità del tubo ad U pescante nel vaso negativo quella che separa il liquido acido dal liquido alcalino.*

Le reazioni col sulfuro di ammonio dimostrano traccie di metallo nel liquido della vasca positiva; quasi nulla nel liquido della vasca negativa. All' elettrode nega-

tivo trovasi un pò di metallo; quasi nulla è depositato sull' elettrode positivo. La membrana dializzatrice che separa il liquido acido dal liquido alcalino, trattata con solfuro di ammonio dà una fortissima reazione e diventa adirittura nera, alla superficie esterna in contatto col liquido alcalino, mentre la membrana dializzatrice della vasca positiva non dà alcuna reazione.

Questa esperienza insieme a tutte le altre, prova adunque che debbono esistere due correnti di particelle elettro positive ed elettro negative che si portano da un polo all' altro. Ma i fatti osservati dimostrano inoltre quanto segue : 1° Che una piccola parte del metallo fissato alla albumina in mezzo acido, essendo dializzabile, traversa la membrana e passa nella vasca negativa per portarsi ell' elettrodo ; 2° Che il metallo che trovasi in mezzo alcalino, portandosi in senso inverso dal polo negativo al polo positivo, e non essendo dializzabile, non ha potuto traversare la membrana e si è depositato sulla superficie esterna di questa, *che guarda il liquido alcalino*, come anche accade nelle membrane otturatrici formate dal coagulo albuminoideo. Ma l'ipotesi qui espressa trova realmente conferma nei fatti? E' vero che le metallo-albumine ottenute per sbattimento colle polveri metalliche abbandonano il metallo in mezzo acido e che questo metallo è dializzabile mentre non lo è quello delle metallo-albumine che si trovano in mezzo alcalino? L'esperienza seguente ha lo scopo di chiarire questo punto.

ESPERIENZA V. — Sbattiano una soluzione di ovo-albumina con polvere di cobalto e di rame ridotti all' idrogeno ed il liquido così ottenuto viene messo a dializzare in due tubi con acqua distillata, dopo averla resa in un tubo lievemente ma nitidamente acida (con acido cloridrico) e nell' altra alcalina (con idrato sodico). Tutte e due le soluzioni erano limpide e trasparenti. Dopo 18 ore, concentrati i liquidi esterni dei dializzatori abbiamo visto forte reazione positiva del metallo nel liquido acido; reazione negativa nel liquido alcalino. Dopo parecchi giorni di dialisi dell' albumina il liquido esterno del dializzatore contenente il liquido acido è ricco di metallo ; l'interno non ne contiene. Il liquido acido contenuto nell' interno del dializzatore non contiene metallo ; il liquido alcalino invece dà una forte reazione positiva. Da queste esperienze si potrebbe concludere che nelle metallo — albumine ottenute per trattamento con le polveri metalliche il metallo combinato si separa lentamente in mezzo acido e diviene dializzabile mentre non si ionizza in mezzo alcalino dal complesso albuminoideo. Ma sarebbe una conclusione troppo recisa perchè non è escluso che si formino in presenza di H'-joni altri complessi metallo — albuminoidei capaci di traversare la membrana. Che questi complessi si formino realmente risulta chiaro dall' esame dei colori che si manifestano nelle membrane albuminoidee sulle quali si deposita il metallo. L'esperienza seguente serve a richiamare l'attenzione del lettore su questo fatto.

ESPERIENZA VIII. — Una soluzione di ovo-albumina, piuttosto concentrata, viene sbattuta per dodici ore con polvere di cobalto, ferro e rame e le albumine così ottenute vengone introdotte in tre sistemi dello apparecchio già descritto, mentre in un quarto sistema si introduce una soluzione di semplice albumina naturale. La corrente elettrica traversa i liquidi per la durata di 48 ore e con 12 volts. Come sempre si formano precipitati al polo positivo e si hanno cambiamenti di colorazione e di reazione. I precipitati si formano più intensi e più rapidamente prima nel sistema — rame, poi nel sistema — cobalto, indi nel sistema — ferro e da ultimo nella albumina normale. Aumentando progressimamente l'acidità, col passaggio della corrente, questi coaguli

si ridisciolgono. Il primo che si scioglie è quello del rame, poi quello del ferro ed in ultimo il leggerissmo intorbidamento dell' albumina normale. Dopo un certo tempo si formano i coaguli diaframma, vicino all' apertura dei tubi comunicanti colla vaschetta catodica. Il coagulo dell' albumina — rame è verde nello strato superiore mentre nello strato inferiore ha assuato colore violaceo. Quello della cobalto--albumina è bruno scuro nello strato superiore mentre nell' inferiore è giallo verdastro. Il coagulo della ferro — albumina è più molle, meno spesso e di colore rosso-arancio nello strato superiore, bianco-grigiastro nell' inferiore. L'albumina normale non ha fatto che un leggero e transitorio anello bianco che non arrivò mai a formare un diaframma otturatore del tubo, come è avvenuto negli altri casi. Tolti i coaguli otturatori, essi si riformano rapidamente e facilmente e sempre vi si osservano quelle iridi colorate a cui sopra abbiamo accennato.

Dopo queste esperienze ci è parso opportuno estendere un po' più minutamente i nostri confronti, sia intorno al modo di comportarsi delle diverse metallo-albumine ottenute per sbattimento con polveri-metalliche, sia di queste in confronto con albumina normale, cui si fossero aggiunti, in eguali proporzioni, sali metallici.

Esperienza IX. — Mettiamo nel solito apparecchio quattro soluzioni di albumina : 1°) Albumina sbattuta a lungo con rame e cobalto, contemporaneamente; 2°) Albumina sbattuta pure a lungo con polvere di cobalto e di rame simultaneamente ma preparata già da tempo per altre esperienze; 3°) Albumina addizionata di soluzione di cloruro di cobalto in quantità tale da avere col solfuro d'ammonio una reazione uguale a quella delle metallo — albumine sbattute coi metalli; 4°) Albumina addizionata di solfato di rame e lievemente neutralizzata con idrato sodico. Quest' ultima era leggermente torbida. Per 24 ore passa una corrente di 10 volts, e come sempre si notano acidità e alcalinità forti ai due poli. Sviluppo di cloro al polo positivo del terzo sistema; liquidi tutti limpidi, meno che al polo negativo del terzo sistema. Colorazione spiccatissima viola (Biureto) al negativo del quarto sistema; colorazione verde bruna e torbida nel negativo del terzo sistema. Formazione di coagulo otturatore in tutti i tubi, ma molto più intenso nelle albumine sbattute col metallo. Sulle membrane otturatrici notansi svariati colori. Al semplice esame non si riesce ad osservare deposizione metallica sugli elettrodi di platino. *Invertiamo la corrente*; poco a poco le reazioni ritornano meno spiccate e rapidamente *si ha forte deposito di metallo sull'elettrodo allora divenuto negativo e che pesca tuttavia in liquido acido.*

Esperienza X. — Una soluzione di ovo-albumina freschissima sbattuta per 18 ore col cobalto ridotto viene messa nell' apparecchio contemporaneamente ad altri tre sistemi nei quali all' albumina normale sono state aggiunte soluzioni equimolecolari di solfato di cobalto di nitrato di cobalto e di cloruro di cobalto in modo che esse reagiscono al solfuro di ammonio colla stessa intensità dell' albumina trattata con polvere metallica. Queste quattro soluzioni sono sottoposte ad una corrente di 12 volts dalle ore 15,30 fino alle ore 19 e poi dalle ore 9 del mattino alle 9 di sera del giorno seguente. Prelevati dei campioni dei quattro sistemi prima ancora di far passare la corrente e saggiati col rosso neutro si nota che la reazione delle soluzioni è diversa, essendo la cobalto-albumina leggermente alcalina, l'albumina normale quasi neutra: le albumine trattata col solfato di cobalto, col cloruro di cobalto e col nitrato di cobalto leggermente acide. La cobalto albumina è limpidissima ; le altre tre un po' torbide per precipitato a minutissimi fiocchi. La cobalto-albumina è incolore con un leggero riflesso giallo, le altre tre sono rosa. Esaminati i diversi sistemi durante il passaggio della corrente che incomincia alle ore 15,30 si nota quanto segue :

Ore 17 — Torbidi i liquidi al polo positivo del cloruro, nitrato e solfato ; i liquidi dei poli negativi sono più limpidi : la cobalto-albumina da sbattimento, è limpidissima ai due poli.

Ore 17,45 — Più torbido il cloruro, poi il nitrato e meno di tutti il solfato. Cobalto-albumina limpidissima ai due poli.

Nella notte non passa la corrente. Il giorno seguente la corrente comincia a passare alle ore 9.

Ore 12 — Tutti i liquidi dei poli positivi torbidi. La cobalto-albumina al positivo è meno acida di quella degli altri sistemi. Col solfuro d'ammonio si riscontra meno metallo al positivo della cobalto-albumina in confronto con i liquidi positivi degli altri tre sistemi.

Ore 15 — Il liquido positivo della cobalto-albumina è molto più torbido di tutti gli altri *pur essendo molto meno acido degli altri tre* Il più acido di tutti i liquidi è il cloruro Trovasi sempre molto più metallo nel liquido positivo dei tre sistemi in cui si sono aggiunti i sali di cobalto che non in quello contenente la cobalto-albumina ottenuta per trattamento con la polvere metallica. In tutti i sistemi è più abbondante il metallo al polo positivo che al negativo.

Ore 17,10 — La cobalto-albumina al polo negativo appare più alcalina alle carte di tornasole.

Al giorno seguente essendo passata durante la notte la corrente si riscontra che il diaframma esiste in tutti e quattro i sistemi. Quello della cobalto albumina è fioccoso, floscio, bruno chiaro ; quello del nitrato è denso e costituisce una vera membrana, sulla quale notasi uno strato bruno-scuro con una intensa macchia verde nella parte centrale. Il coagulo del solfato è denso e colorato in bruno nello strato superiore e in blù nello strato inferiore che guarda il liquido alcalino. Quello del cloruro è bruno, ma nello strato superiore è bleu e quà e là notasi anche una intensa colorazione rosa. Tutti e quattro i diaframmi sono collocati verso le estremità del tubo comunicante che pesca nella vaschetta positiva, poichè il liquido del tubo ad U che fa comunicare i due vasi è tutto alcalino. Il liquido nella vasca negativa della cobalto-albumina è fortemente bruno, quello degli altri sistemi è incolore.

Ore 17,20 — Nel vaso contenente l'albumina, cui fu aggiunto il cloruro di cobalto, notasi che il diaframma è divenuto intensamente colorato in bleu senza il colore bruno e roseo che si notava al mattino. Nel vaso contenente il solfato di cobalto il diaframma è divenuto bleu però meno intensamente che lo fosse al mattino. Nel vaso contenente il nitrato di cobalto il diaframma ha assunto un colore intenso bleu-verde. *Nella cobalto **albumina** il diaframma mantiene il solito colore bruno chiaro.*

Ore 17,40 — Sembra che il colore bleu-verde tenda a scomparire nei diaframmi dei sistemi contenenti i sali metallici. *Il liquido positivo della cobalto **albumina** è sempre molto più torbido e sempre molto meno acido degli altri.* Al polo negatio del sistema cobalto-albumina, il liquido è colorato molto intensamente in giallo bruno. negli altri sistemi il liquido negativo è quasi incolore.

Al giorno seguente, anche sul diaframma della cobalto-albumina notasi una leggera colorazione bleu. Il liquido al polo negativo è sempre molto colorito in bruno mentre negli altri sistemi detta colorazione è appena accennata.

La corrente viene interrotta e si fa la ricerca del metallo. Nel liquido della vasca positiva della cobalto-albumina, trovasi una reazione di metallo più intensa che in quella del liquido negativo : il contrario si osserva nei sistemi del nitrato, solfato, cloruro. L'analisi quantitativa del metallo depositato agli elettrodi dimostra maggiore quantità di cobalto sugli elettrodi del nitrato, solfato e cloruro che non in quelli della cobalto- albumina. In tutti i casi il cobalto trovasi in quantità rilevantissima sopra i diaframmi. Un esperienza analoga ripetuta con rame-albumina e albumina cui fu aggiunte solfato, nitrato e cloruro di rame, ha condotto ad uguali risultati.

ESPERIENZA XI. — Alle ore 18,45 mettiamo nei quattro sistemi dello apparecchio i seguenti liquidi : 1° Albumina sbattuta per circa tre ore con nickel. Il liquido così ottenuto assume (vedansi per questo i citati lavori) un' aspetto lattiginoso che non si perde neppure dopo una prolungata centrifugazione. Trattasi di una flocculazione in fiocchetti invisibili al microscopio se non a forti ingrandimenti. 2° Albumina cui furono aggiunte alcune goccie di una soluzione 10/N di cloruro di nichel (3 goccie su 20 centimetri di soluzione). 3° Albumina con aggiunta di solfato di nichel soluzione 10/N nella proporzione suddetta. La quantità dei sali aggiunti era tale, che al solfuro d'ammonio si aveva reazione ugualmente intensa come nell' albumina trattata colle polveri metalliche.

Al giorno seguente dopo 10 ore di passaggio di una corrente di circa 20 volts si nota quanto segue : *Albumina sbattuta col nichel* : il liquido del *polo negativo* è incolore, torbido, collo stesso aspetto lattiginoso di quando fu messo nell' apparecchio. Lieve coagulo al fondo del vaso. Reazione alcalina. Il liquido del *polo positivo* è più torbido, più lattiginoso, acido. Si riducono i due liquidi alla stessa concentrazione idrogenionica servendosi del rosso neutro come indicatore ed aggiungendo al liquido acido piccole quantità di una soluzione diluita di idrato sodico. Per ridurre il liquido acido alla stessa concentrazione idrogenionica del liquido alcalino occorrono sei goccie della soluzione 10/N di soda. Aggiungendo solfuro d'ammonio nei due vasi ed in uguale quantità notasi reazione più intensa di metallo al *polo positivo.* Nel tubo ad U notasi la solita membrana situata all' estremità che è verso il polo positivo, la membrana è piccola, floscia incolore ; *Albumina cui fu aggiunto il solfato di nichel* : il liquido del *polo negativo* è lievemente torbido, colorato un pò in giallo e presenta lieve coagulo al fondo del vaso. Il liquido del *polo positivo* è limpido, incolore, acido. Ridotti i due liquidi alla stessa concentrazione idrogienionica riscontrasi anche in questo caso maggiore quantità di metallo al polo posit vo, per aggiunta di solfuro di ammonio. La memabrana del tubo ad U è anche qui molle ed ha assunto un colore bianco grigiastro. Il fenomeno più rilevante è che in questo caso la quantità di soda che occorre per ridurre il liquido acido del polo positivo alla stessa concentrazione idrogenionica del liquido alcalino negativo *è cinque volte maggiore* di quello che occorre per l'albumina sbattuta semplicemente col metallo. *Albumina cui fu aggiunto il cloruro di nichel.* Risultati in tutto analoghi a quelli descritti per l'albumina-solfato.

Da queste esperienze si rilevano i tre fatti seguenti che confermano quanto già nelle altre esperienze si è constatato e cioè : 1° Che l'acidità del liquido al polo positivo è sempre minore nelle metallo-albumine ottenute per trattamento con polveri metalliche che non in quelle cui furono aggiunti sali metallici. 2° Che nonostante la minore acidità della soluzione *la coagulazione dell' albumina al polo positivo è sempre maggiore nelle albumine preparate colle polveri metalliche che non in quelle cui furono aggiunti i sali metallici.* Questo fatto dimostra come il fénomeno della coagulazione dell' albumina in ambiente acido sia un fenomeno complesso e non in stretto rapporto col grado di acidità del liquido in cui esso avviene. 3° Che le albumine-metallo ottenute per trattamento delle polveri metalliche non si comportano, per quanto riguarda la separazione del metallo, il colore delle soluzioni, l'intensità della coagulazione ecc. allo stesso modo delle albumine cui furono aggiunti nella stessa proporzione dei sali metallici. Questa differenza è molto più sensibile nella albumina-cobalto che non nelle albumine trattate con altri metalli, e questo forse sarà in relazione colla facilità che questo metallo ha di originare

numerosi complessi chimici colla molecola albuminoidea. Un indice di questa attitudine del metallo si può avere riflettendo ai composti roseo-cobaltici e luteo-cobaltici ai quali il cobalto dà facilmente origine.

Ma a dimostrare quanto siano complessi questi fenomeni si può portare ad esempio il modo tutto affatto diverso di comportarsi sotto l'azione della corrente della albumina sbattuta con antimonio. Come altrove abbiamo accennato, questo metallo è fissato in piccola quantità dall' albumina. Tuttavia per un prolungato sbattimento si può alla analisi rilevare che una notevole quantità di metallo è in queste condizioni trattenuta. Le esperienze seguenti ci dimostrano come si comporti l'albumina-antimonio allorquando sia sottoposta al passaggio della corrente elettrica.

ESPERIENZA XIII. — Per due notti ed un giorno consecutivamente si sbatte una soluzione di ovo-albumina con antimonio metallico finissimamente polverizzato (metallo-albumina che doveva servire ad altre esperienze). Un campione di questa albumina-antimonio è messa nell' apparecchie la sera e si fa passare una corrente di 16 volts per tutta la notte. Al mattino si osserva che i liquidi sono limpidi, tanto al polo negativo che al polo positivo. Nessun coagulo è visibile come pure *non si ha alcuna formazione di membrana*. L'elettrodo negativo è nero per una forte quantità di metallo depositatovi. Questa esperienza che dà risultati contrari a quelli finora ottenuti può forse essere spiegata ammettendo che il prolungato sbattimento abbia finito collo staccare il metallo dalla sua combinazione albuminoidea, rendendolo dializzabile e quindi atto a comportarsi come il Jone-metallo di una sale ovvero che l'antimonio non contragga vere combinazioni coll' albumina e formi complessi di natura diversa da quelli che si hanno coi metalli fin qui studiati.

Certamente l'albumina deve essere considerata come un complesso chimico estremamente metastabile, cosicchè le sue proprietà di fissare il metallo debbono variare non solo di fronte ai diversi metalli, ma anche per effetto delle modificazioni che l'acidità, l'alcalinità o altre condizioni potranno apportare alla struttura della sostanza proteica. Per avere un idea di questi fenomeni abbiamo pensato di confrontare il modo di comportarsi, sotto l'azione della corrente, dell' albumina-metallo ottenuta da sbattimento colle polveri metalliche, *prima e dopo l'ebollizione*. Poichè come si è già detto le albumine trattate collo polveri metalliche diventano incoagulabili al calore. L'esperienza seguente dà idea di questi fenomeni.

ESPERIENZA XIV. — Mettiamo nell' apparecchio : 1° sistema albumina normale sbattuta col nichel finemente polverizzato. Nel 2° albumina sbattuta col nichel, ma portata per pochi istanti alla ebollizione. La piccola quantità di liquido evaporatasi nell' ebollizione viene aggiunta alla soluzione prima di sottoporla all' esperienza. L'albumina nichel, che come abbiamo detto in seguito allo sbattimento col metallo assume un aspetto lattiginoso, non lo perde anche se portata all' ebollizione. Nel 3° Albumina con aggiunta di solfato di nichel in soluzione 10/N in modo da avere al trattamento col solfuro d'ammonio la stessa intensità di reazione che si ha nei liquidi sopra indicati. I vasi sono messi nell' apparecchio alle ore 15. La corrente è di 20 volts.

Ore 16. — Si osserva che nel vaso positivo dell' albumina sbattuta con nichel e *bollita*, dall' elettrode cade un volo di albumina coagulata che non si osserva nè nell' albumina nichel *non bollita* nè in quella cui fu aggiunto il solfato di nichel. Si stacca, con un bastoncino di vetro, il coagulo che cade nel liquido e si ridiscioglie.

Ore 16,15. — Il coagulo nell' albumina bollita si è riformato : nessun coagulo negli altri liquidi positivi del sistema albumina non bollita e albumina solfato.

16,45. — Il coagulo che pende dall' elettrode positivo nell' albumina bollita è fortissimo : sempre nulla si osserva negli altri sistemi.

Ore 18,45. — Si è seguito l'andamento del fenomeno e si è notato sempre coagulazione forte nel liquido positivo dell' albumina bollita, mentre i liquidi degli altri sistemi si mantengono limpidi. Al giorno seguente notasi quanto segue :

Sistema contenente la *nichel-albumina non bollita* : Ai poli positivo e negativo il liquido è opaco lattescente, rispettivamente acido ed alcalino. Lieve deposito di albumina coagulata al fondo dei due vasi. Sistema contenente *l'albumina-nichel sbattuta e bollita* : Opachi e sempre lattescenti i liquidi al polo negativo e positivo con lieve deposito di albumina coagulata al fondo dei vasi. Al polo positivo si è formata la membrana solita, alla estremità del tubo ad U e da questa parte un grosso coagulo in forma di stalattite che si prolunga col coagulo che è al fondo del vaso. Nulla di simile come si é detto si vede nè nell' albumina nichel non bollita nè in quella a cui si è aggiunto il solfato di nichel. Al giorno seguente essendo passata la corrente attraverso i liquidi per tutta la notte si osserva alle :

Ore 11. — Nel sistema nichel-albumina non bollita lieve coagulo fioccoso nella parte alta e curva del tubo ad U. Nel sistema albumina nichel bollita, come già nella sera precedente, si ha al polo positivo la membrana che si è ancora inspessita e forte coagulazione nel liquido del vaso positivo ; coagulo che per agitazione del liquido in parte si ridiscioglie. Nell' albumina, cui fu aggiunto il solfato di nichel, notasi al polo positivo lievissimo coagulo nella parte alta e curva del tubo ad U, come nella Nichel-albumina non bollita.

Ore 17. — S'interrompe la corrente e si riducono i liquidi acidi dei vasi positivi alla stessa concentrazione idrogenionica dei liquidi dei vasi negativi con aggiunta di poche goccie di soluzione 10/N di potassa. Si ha così uguale colore giallo in tutti i liquidi ai quali si aggiungono poi due goccie di solfuro di ammonio. Per aggiunta di questo reattivo si nota, in tutti i sistemi, reazione del metallo più forte nei liquidi dei vasi positivi. La differenza si mantiene abbastanza sensibile e visibile anche nei giorni seguenti. Ma un altro fatto notevole si rileva. La differenza nei due vasi contenenti i liquidi negativo e positivo nella nichel-albumina, semplicemente sbattuta colla polvere e non bollita, è bene visibile, ma *piccola.* Invece è *fortissima* nell' albumina nichel bollita. Infatti il liquido corrispondente al polo negativo per aggiunta di solfuro di ammonio divien appena scuro. Il liquido corrispondente al polo positivo diviene quasi nero. Si dovrebbe adunque pensare che l'ebollizione dell' albumina ha facilitato il trasporto delle particelle elettro negative al polo positivo e che insieme a queste più facilmente vi ci sia condotto il metallo.

Esperienza XVI[a]. — Si mettono nell' apparecchio in tre sistemi albumina sbattuta con cobalto metallico. 2° Albumina sbattuta con cobalto metallico, ma sottoposta per alcuni istanti alla ebollizione, riportando al volume primitivo ciò che nei pochi istanti di ebollizione si era evaporato. 3° Un campione della stessa albumina mantenta a 80 gradi per 20 minuti. Si fa passare la corrente di 20 volts e dopo alcune ore notasi al polo positivo dell' albumina-cobalto bollita, una coagulazione molto più forte che non nell' albumina non bollita. Nel sistema contenente l'albumina mantenuta alla temperatura di 80 gradi la coagulazione al polo positivo non è molto differente dal normale. Al mattino seguente (essendo passata la corrente tutta la notte) notasi che si è formata la membrana in tutti e tre i tubi di comunicazione, ma nell' albumina bollita il coagulo fu molto più forte e la membrana molto più scura e densa che non nell' albumina che non fu sottoposta all' ebollizione. Nell' albumina mantenuta ad 80 gradi la membrana per densità e colore sta fra le due albumine predette. La ricerca quantitativa del metallo dimostra che in tutti e tre i casi esso si è portato in prevalenza al polo positivo, ma questo trasporto è molto più intenso nell' albumina scaldata ad 80° ed in quella bollita che non nella albumina normale.

ESPERIENZA XVI^{b}. — Si sbatte con rame, ben ridotto all' idrogeno, una soluzione di albumina e si ripete l'esperienza fatta col cobalto: una parte dell' albumina cioè è sottoposta all' ebollizione, l'altra è mantenuta alla temperatura di 80 gradi. La corrente passa attraverso i liquidi per 16 ore e con un voltaggio uguale a 20 volts. Dopo questo tempo notasi che in tutti e tre i tubi di comunicazione si è formata la membrana ed in tutti e tre i liquidi del polo negativo si ha la caratteristica colorazione del biureto, però la membrana nell' albumina semplicemente sbattuta con polvere di rame si presenta resistente e nello strato superiore che guarda il liquido alcalino (in tutti e tre i-sistemi il contenuto del tubo ad U è alcalino) presenta un deposito metallico scarso di colore verde. La membrana nell' albumina bollita si presenta invece molto più resistente ed il metallo depositatovi ha un colore tendente al bleu. L'analisi dei liquidi col solfuro d'ammonio dimostra che in tutti e tre i casi il metallo si è portato prevalentemente al positivo. Un fatto importante a notarsi in questa esperienza è che l'albumina sbattuta con polvere di rame se è fatta bollire acquista il caratteristico colore del biureto e assume spiccata reazione alcalina: per questo allorquando si è cominciata l'esperienza i liquidi messi nell' apparecchio presentavano un leggerissimo colore viola. In molti trattati di chimica fisiologica come ad esempio in quello del Conheim leggesi che le soluzioni albuminose, se neutre od acide, diventano alcaline allorquando si coagulano al calore e la ragione di questo fenomeno è ignota. Le nostre esperienze ci permettono di affermare che questo passaggio alla reazione alcalina nelle albumine si può verificare *anche indipendentemente da qualsiasi coagulazione.*

ESPERIENZA XVII. — Si sbatte con polvere di cobalto, ridotto dall' ossido, una soluzione di ovo-albumina. Dopo prolungata centrifugazione una parte di questa è mantenuta a 60 gradi per venti minuti e viene messa in un sistema dell' apparecchio, insieme ad altri due sistemi contenenti: *uno*, albumina normale non trattata con le polveri metalliche e l'*altro*, albumina sbattuta con cobalto, ma non riscaldata. La corrente di 30 volts passa per quattro ore, dalle 15 alle 20 e poi per tutte la notte fino al giorno seguente con 20 volts. Al mattino seguente notasi che nell' albumina normale non trattata con metallo non si ha alcuna formazione di membrana, ma solo un lieve coagulo al fondo del vaso positivo. Nell' albumina trattata col metallo, ma non riscaldata si ha una membrana piccola, fioccosa, con lieve colorito bruno alla parte superiore e notasi anche lieve coagulo al fondo del vaso positivo. Nell' albumina scaldata a 60° la membrana si nostra più resistente, di colore molto più bruno, ad anche il coagulo al fondo del vaso positive è più abbondante. Nell' albumina bollita si ha forte coagulo al fondo del vaso positivo. Il liquido superiore è quasi scolorito, la membrana è spessa nerissimo, quasi come inchiostro e si diffonde e si estende dalla estremità del tubo fin verso il fondo del vaso. L'analisi quantitativa del metallo dimostra maggiore deposito di metallo nei liquidi dei vasi positivi come negli altri esperimenti.

ESPERIENZA XVIII. — Si ripete l'esperienza con l'albumina-rame mettendo nell' apparecchie due sistemi: uno contenente albumina sbattuta e non bollita; l'altro: la stessa albumina sbattuta e bollita per cinque minuti poi riportata con aggiunte di acqua distillata al volume primitivo. Come si è detto, nell' ebollizione l'albumina assume un lieve colore violaceo. Si fa passare una corrente debole di quattro volts, alle ore 16.

Ore 18. — Si inizia la coagulazione al polo positivo dell' albumina bollita, mentre nulla si osserva nel liquido dell' altro sistema.

Ore 19. — Sempre più notevole la coagulazione al polo positivo nell' albumina bollita dove un coagulo pende dall' elettrode. Nulla nel l'altro. Al giorno seguente:

Ore 8,30. — Colore viola, molto visibile nei due liquidi negativi dei due sistemi; molto maggiore è la coagulazione al polo positivo della albumina bollita. Si fa passare una corrente di 10 volts.

Ore 11,30. — Nell' albumina bollita comincia a formarsi all' estremità del tubo ad U la membrana. Nulla nell'altra.

Ore 15. — Membrana spessa nell' albumina bollita : in quella non bellita semplice coagulo fioccoso e molle all' astremità del tubo ad U.

Ore 17. — Bella e spessa membrana nel tubo dell' *albumina bollita*. Il metallo vi è depositato sopra con colore verdognolo e quà e là notansi punti intensamente colorati in bleu. Nel tubo *albumina non bolita* non vi è una vera membrana, ma solo un coagulo fioccoso lievemente colorato in verdogolo in un punto solo.

Ore 19. — Si va formando una lieve membrana anche nel tubo dell' albumina non bollita, ma quella dell' altro tubo ad U è senza paragone più spessa e vi è depositato sopra grande quantità di metallo. Si toglie la corrente di 10 volts e si lascia passare per tutta la notte una corrente di tre volts. Al giorno seguente si trova che la membrana si è formata in tutti e due i sistemi, ma quella dell' albumina *non bollita* è sempre molle e contiene poco metallo. L'analisi dimostra che in questa membrana vi è piccola quantità di metallo depositata mentre molto ve ne è nella membrana dell' *albumina bollita*. Anche in questo caso vi è più metallo nei vasi positivi che nei vasi negativi e più in quello positivo dell' albumina bollita che non in quello dell' albumina che non fu sottoposta all' ebollizione.

Esperienza XIX. — Si sbatte con polvere di antimonio, per un giorno ed una notte, una soluzione di ovo-albumina. Il liquido lungamente centrifugato si divide in due porzioni una delle quali è sottoposta all' ebollizione per alcuni minuti. I due liquidi sono messi nel solito apparecchio e sottoposti ad una corrente di quattro volts per cinque ore. Dopo questo tempo notasi che al polo positivo della albumina-antimonio *bollita* si ha un lieve coagulo che non si riscontra al polo positivo dell' altro sistema. Nessun deposito di metallo si ha agli elettrodi. Si riduce la corrente a due volts e si lascia passare per un notte intera. Al mattino seguente non riscontrasi deposito di metallo sugli elettrodi e allora si porta la corrente a 15 volts. Dopo due ore si trovano gli elettrodi negativi, in entrambi i sistemi scuri per metallo che vi è depositato. Grossi fiocchi di albumina coagulata nuotano nel liquido opalescente del polo positivo della albumina bollita mentre nel liquido del polo positivo dell' altro sistema non si rileva che un piccolissimo intorbidamento. Si diminuisce la corrente portandola a 4 volts. Dopo quattro ore gli elettrodi negativi si fanno più scuri e più quello dell' albumina non bollita. Si sospende il passaggio della corrente e si fa la ricerca del metallo, riscontran dosi più metallo nei vasi del polo positivo tanto in un caso che nell' altro. *Mai*, in esperienze analoghe a questa, si è potuto constatare la formazione della membrana.

Molte altre esperienze potremmo ancora citare, ma crediamo inutile il farlo poichè tutte quante concordano nel dimostrare che in una albumina-metallo, portata all' ebollizione, ed anche semplicemente scaldata a 50°-60°, il metallo si dissocia dal jone-albuminoideo o assume col medesimo la forma di un complesso chimico tale da rendere molto più facile e rapido il passaggio al polo positivo delle particelle elettronegative albuminose insieme al metallo che è loro unito, sia questa unione chimica o fisica. Inoltre la rapida e intensa coagulabilità dell' albumina bollita o riscaldata al polo positivo coagulabilità che non si riscontra nell' albumina non sottoposta a riscaldamento, dimostra chiaramente quali profonde modificazioni una temperatura anche relativamente bassa possa portare nella compagine della molecola proteica. Già in un' altro scritto dicevamo, e qui ci piace ancora ricordarlo, che la stabilità del sistema chimico formato dalle sostanze proteiche e da quelle che colle stesse reagiscono è instabilissimo e che sotto influenze catalitiche diverse le molecole metastabili subiscono continue degradazioni passando a forme più stabili, cosicchè la vita

organica, che creò alla natura riserve di energia utilizzabile, mantiene la materia sotto la forma di specie metastabili ed in continuo equilibrio mobile, per ritardarne la evoluzione verso il riposo definitivo. In tal modo si comprende come la fissazione di un metallo, di un veleno, di un farmaco alle sostanze proteiche non si possa considerare nelle forme e cogli schemi così semplici, come si è fatto finora. Noi siamo ben lungi dal volere applicare questi concetti, in modo assoluto, alle esperienze che formano oggetto del presente lavoro, perchè troppo diverso è l'andamento dei fenomeni nell' organismo vivente da quello che può accadere in un tubo da saggio o in un vaso, nei nostri laboratori. Tuttavia le esperienze, sopra riferite, sia pure indirettamente, non ci paiono prive di interesse per la biologia e la farmacologia. Esse, provando la grande termolabilità dell' equilibrio mobile porteico, spiegano il fatto, già noto, che la temperatura può modificare notevolmente la fissazione e quindi anche l'azione dei farmaci e dei veleni. E si può anche comprendere che la termolabilità di certi sieri, che perdono per azione della temperatura le loro proprietà biologiche, ad altro non è dovuta se non al modificarsi di determinati equilibri chimici. La formazione del coagulo albuminoso nel punto chimicamente ed elettricamente neutro, che separa due liquidi dotati di reazione e di cariche elettriche opposte, insieme al modo diverso di comportarsi delle varie albumine coi vari metalli sotto questo punto di vista, può forse dare un pò di luce sulle svariate attività fisiologiche dei metalli, sul loro depositarsi in vari organi, sulla lentezza della loro eliminazione e così via.

Altre considerazioni potrebbero pur farsi, ma bastino queste. Noi non ci nascondiamo tuttavia che le esperienze, sopra descritte, sono ancora incomplete, oscure e in molti punti inesplicabili, ma il biologo deve, pur troppo e spesso, servirsi di metodi imperfetti per cercare di conoscere, sia pure superficialmente, la struttura e la funzione della materia vivente.

—

CONCLUSIONS.

En agitant des solutions d'œuf-albumine ou de sérum de sang avec des poudres métalliques, le métal se fixe sur ces substances protéiques, lesquelles restent dénaturées. Elles prennent des couleurs variées, changent leurs réactions, ne coagulent plus par la chaleur et deviennent imputrescibles. La fixation du métal est indépendante de la réaction de la solution protéique et survient même dans les solutions qui ont été privées des gaz et des sels qu'elles tiennent dissous. Le métal fixé n'est pas décelable par les réactifs ordinaires ; il n'est pas dialysable et même ses propriétés ionomagnétiques sont disparues Tous les métaux ne sont pas également retenus par les solutions protéïques. Quelques-uns sont bien fixés, comme le cobalt. le cuivre, le fer ; d'autres moins, comme l'aluminium et le plomb.

La cobalt métallique, qui est le plus fixé de tous les autres métaux. ne l'est plus du tout s'il se trouve à l'état d'oxyde. Il en est de même pour d'autres métaux.

Dans une série de travaux antérieurs on a cherché à analyser cette activité chimique de l'albumine avec les métaux; à ceux là on renvoye le lecteur.

Dans le présent travail on étudie comment la métal-albumine ainsi obtenue se comporte vis-à-vis du courant électrique.

Les conclusions peuvent être résumées ainsi :

1) Lorsqu'un courant électrique traverse une métal-albumine obtenue par agitation avec des poudres métalliques, les parcelles albuminiques (dans un milieu alcalin) se chargent électro-négativement et se portent au pôle positif. Avec elles, même au pôle positif, est transporté le métal fixé.

2) En même temps on a un courant direct en sens contraire, en conséquence de quoi les parcelles albumineuses (dans un milieu acide) se chargent électro-positivement et se transportent au pôle négatif où une partie du métal se dépose sur l'électrode.

3) Dans le point chimiquement neutre, où la masse est même électriquement homogène, se forme un coagulum albuminoïde qui se transforme en une vraie membrane. Sur cette membrane se dépose le métal fixé.

4) De l'ensemble de ces phénomènes il est possible de conclure que le métal forme avec l'albumine, non pas un, mais plusieurs complexes chimiques, et que le métal fixé sur l'albumine, quand il se trouve dans un milieu acide, devient dialysable, mais ne l'est pas dans un milieu alcalin.

5) Ces phénomènes varient, en partie, pour les divers métaux et pour les diverses albumines. L'ébullition, ou même le simple échauffement d'une solution métal-albumineuse à 50°-60°, modifie profondément sa manière de réagir dans le champ électrique pour ce qui concerne la coagulation, la formation de la membrane, la formation des complexes chimiques, la dialyse du métal.

6) Ces recherches démontrent que la thermo-labilité des sérums, la fixation des métaux dans certains organes, leur élimination, etc. sont liées à la formation de complexes chimiques métastabiles et dépendent du changement d'équilibres chimiques.

ISTITUTO DI MATERIA MEDICA E FARMACOLOGIA SPERIMENTALE DELLA
R. UNIVERSITA DI GENOVA
DIRETTO DAL PROF, ALBERICO BENEDICENTI

Contributo alla tossicologia e farmacologia dei fiori della Sophora japonica

nota del

DOTT. ALBERTO GARELLO

Un giardiniere molto intelligente ed innamorato delle piante, il Signor Bucco, nel tempo in cui fu 'addetto all' Orto Botanico della R. Universita di Genova, sotto la guida del chiarissimo Prof. PENZIG, abbellì giardini e viali della Città di Genova con molte piante esotiche e rare. Fra queste è da ricordare la SOPHORA JAPONICA che è originaria della China e del Giappone. Sono i fiori di questa pianta quelli che formano oggetto delle presenti mie ricerche.

—

Il materiale per le ricerche chimiche e fisiologiche sulla SOPHORA JAPONICA, si può avere, con una certa facilità. La fioritura di questa pianta avviene nel mese di Luglio, e in Agosto i fiori cadono al suolo in tale abbondanza da ricoprire di un giallo tappeto tutto il terreno circostante.

—

I dati chimici che si hanno finora sulla SOPHORA JAPONICA e piante affini, riguardano più specialmente i semi di queste piante. — Poco studiati sono stati i fiori. Dai boccioli fiorali gialli della SOPHORA JAPONICA, W. STEIN (*Journ.-prakt. Chem.* 58-1853-399) isolò nel 1853 una sostanza colorante gialla, che dai Cinesi e Giapponesi veniva già da antico tempo usata per colorare le seta. Questa sostanza, che fu ritenuta Sophorina, fu poi identificata colla Rutina, ramnoside, che si trova pure nei boccioli fiorali del Cappero, dal quale venne isolata farmacologicamente, in questo stesso laboratorio, dai DOTTORI CANTONI e GARINO. Nel 1882 P. FOERSTER (*Ber. d. Chem. Ges.* 15-1882-215) come prodotti di scissione della SOPHORINA, isolò la Quercitina ed uno

zucchero che sarebbe la Isodulcite. Più tardi R. WOCHS (Inaugural Dissertation. Dorpat), ritornando sopra questi studi, ottenne pure la Isodulcite rappresentando la formula di scissione della SOPHORINA come segue :

$$C_{27} H_{30}O_{16} \text{ Sophorina} + 3H_2O = \text{Sophoretina}$$
$$C_{15} H_{10}O_7 + \text{Isodulcite } C_6 H_{14}O_6 + (\text{Zucchero d'uva}) \; C_6 H_{12}O_6$$

Le ricerche ancora più recenti dello SCHMIDT (*Arch. Pharm.* 1904. Vol. 242, pag. 210) e suoi allievi avrebbero dimostrato l'identità assoluta della Sophorina colla Quercitina.

Fra i fiori di Papilionacee che furono pure oggetto di studio debbo rammentare anche quelli del Cytisus Laburnum, arbusto comune che cresce nei boschi delle regioni marittime e montane d'Italia, e quelli del Cytisus alpinus comune nelle Alpi ed Appennino, fino nelle Marche. Da questi fiori furono isolati due alcaloidi, la Cytisina e la Laburnina. Si vuole che in talune regioni si mangino fritti i fiori di alcune specie affini; ed essendo stati scambiati i fiori del Cytisus con questi si ebbero a deplorare casi di avvelenamento nell'uomo. Le statistiche dimostrano che questi casi di avvelenamento non sono rari; se ne annoverano 231 con mortalità del 2 %. Pare che una sola volta la Cytisina sia stata usata a scopo omicida. Piu studiati dei fiori di queste Papilionacee, come ho già detto, furono i semi, che dettero motivo a molte ricerche. Dai semi della Sophora Tomentosa, PLUGGE (*Arch. Pharm.* 1891. Vol. 229, pag. 571) in un suo recente lavoro, nel 1891, riuscì ad isolare un alcaloide non bene identificato ma che pare corrisponda ad un altro alcaloide, la Sophorina che sarebbe stata isolata dal GRESHOFF (*Arch. Pharm.* 1891-229-563) dalla Sophora Speciosa.

Questa denominazione usata tanto per l'alcaloide come per il glucoside ha dato origine a molte confusioni in questo già di per sè intricato argomento.

Questo alcaloide avrebbe la curiosa proprietà di mantenere il sangue estratto dal corpo, più a lungo ossigenato. In un posteriore lavoro PLUGGE e RAUWERDA (*Arch. Pharm.* 1896-234-685) ricercarono la Cytisina in diverse Papilionacee esaminando 98 specie di Cytisus, 10 di Genista, 11 di Sophora, 10 di Baptisia, 4 di Ulex, 1 di Anagyris, e molte altre di Albizzia, Amorpha, Antyllis, Arthrolobum, Caragana, Caronilla, Desmodium, Gleditschia, Glycine, Knedya, Lathyrus, Psoralia, Robinia, e Tetragonolobus, e trovarono risultati variabili in quanto che talvolta la Cytisina era presente e talvolta, anche in specie molto affini, mancava.

Anche dai semi di un' altra comune Papilionacea, l'Ulex europeus, è stato estratto un alcaloide detto Ulexina ma che fu poi identificato colla Cytisina sopra ricordata.

Premesse le cose sopra descritte si comprende come potesse essere utile riprendere lo studio dei fiori della Sophora japonica per constatare :

1° Se essi pure contenevano la Cytisina finora isolata, soltanto dai semi di questa pianta o una sostanza Cytisinogena da cui la Cytisina derivasse ;

2° Se si potesse riscontrare la Rutina (Sophorina del GRESHOFF) e se la quantità di questo ramnoside variasse a seconda dei periodi di fioritura.

La Rutina è stata gia studiata come si é detto, dal punto di vista farmacologico e pel suo comportamento nell' organismo, in questo Laboratorio (CANTONI VITORIO : Contributo allo studio farmacologico delle Capparidacee : *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie.* Vol. 23, fasc. 1-2, 1913. — Dott. M. GARINO über das Verhalten einiger Rhamonoside im Tierkörper ; *Hoppe-Seylers Zeitschrift für Physiologische Chemie.* Bd. 88, Heft I, 1913).

Quindi, sotto questo punto di vista, lo studio di questa sostanza si poteva dire esaurito. Non così é della Citysina della quale poco si sa.

Essa fu studiata dal PLUGGE allo stato di impurezza. Nelle sue ricerche constatò semplicemente che produceva la morte in topi e rane con progressivi sintomi di paralisi.

Nel trattato tossicologico del KOBERT questa sostanza é indicata come capace di produrre un forte eccitamento del sistema nervoso centrale con convulsioni tetaniche ; egli afferma anche che la Cytisina produce un aumento della pressione arteriosa ; talvolta aumento, e talvolta rallentamento del polso, ed inoltre nausea, vomito, e salivazione ; fenomeni e sintomi questi che il PLUGGE non ha mai rilevato —Uno studio più esatto di questa sostanza, come si vede, poteva essere utile dal punto di vista farmacologico. Con alcune sperienze preliminari volli vedere se i fiori di Sophora japonica fossero veramente velenosi ed usai per questo scopo il decotto acquoso al 20 % dei fiori ; liquido di colore bruno rossastro di reazione acida di sapore amaro e che riduce fortemente il reattivo del Fehling. — Questo fenomeno della riduzione richiamò per primo la mia attenzione ; infatti notai che talvolta la riduzione era assai intensa, talvolta molto minore.

Esaminando la cosa più attentamente ho potuto stabilire che gli estratti preparati con fiori freschi e raccolti in Luglio hanno un potere riduttore fortissimo ; quelli preparati con fiori raccolti alla fine di Luglio e primi di Agosto riducono pochissimo. Questo fatto non deve meravigliare poiché i bei lavori di BOURQUELOT e dei suol alunni (*Arch. der Pharmazie* 1909, 447, pag. 143) hanno dimostrato come le variazioni quantitative degli zuccheri e dei glucosidi siano dovute alla scomparsa graduale di queste sostanze che sono da considerarsi come materiale di riserva nelle piante. Stando al caso speciale ricorderò come la Rutina (Sophorina) sia abbondante o scompaia quasi totalmente nei fiori e nelle foglie dell Cappero a seconda del periodo di vita delle piante, come il Dott. GARINO ha di recente dimostrato in questo Istituto (Sul significato biologico della Rutina, ramnoside della Capparis Spinosa).

Sperimentai dunque l'azione fisiologica del decotto di fiori di Sophora japonica e così ho potuto notare che, alla dose di 1 cm^3 iniettato sottocute ad un topolino produce la morte dell' animale entro lo spazio di circa tre ore. Dapprima si mostra ipersensibilità, cosicché l'animale, appena toccato, reagisce fortemente allo stimolo; in seguito i movimenti si fanno più torpidi senza che la sensibilità sia diminuita ; un pò più tardi l'animale incomincia a muoversi lentamente ; si trascina al suolo, cade su di un fianco, e da ultimo la sensibilità diminuisce rapidamente ; i movimenti volontari e riflessi si aboliscono ; la sensibilità scompare e la morte avviene in uno stato comatoso. Ripetuta l'esperienza in altri topi ebbi lo stesso risultato.

—

Accertata così la presenza di un veleno in questi fiori volli procedere all' isolamento della sostanza tossica. Nella prima esperienza presi 100 gr. di fiori finemente pestati di Sophora japonica e li macerai per 12 ore in un recipiente con alcool assoluto, poi estrassi a caldo per circa un' ora in apparecchio a ricadere, filtrai ed evaporai l'alcool ottenendo un residuo denso di un colore verde cupo che, trattato con acqua, dà abbondante precipitato che si separa per filtrazione.

Il liquido filtrato riduce il reattivo del Fehling ed é tossico uccidendo gli animali con i sintomi già sopra ricordati.

Avendo così dimostrato chiaramente la tossicità dei fiori della Sophora japonica restava a vedere se questa era dovuta alla Cytisina. Operai allora su grande quantità di fiori seguendo il metodo che per l'estrazione della Cyptisina è dato dal PLUGGE.

La polvere ottenuta dalla triturazione dei fiori di Sophora japonica essicati è trattata con acqua leggermente acidulata con H_2SO_4 per lo spazio di una notte.—Si filtra; nel filtrato di colore giallo cupo si neutralizza l'acidità dell'H_2SO_4 con acqua di calce — il filtrato cosi ottenuto si tratta con acetato basico di piombo che dà un abbondante precipitato — si toglie l'eccesso del Pb con H_2SO_4 — si filtra ancora e si neutralizza il filtrato con carbonato sodico — il filtrato, dopo averne separato per filtrazione il nuovo precipitato, si concentra a bagno maria, riducendo la sostanza a circa un quarto del suo volume e mantenendo sempre la reazione alcalina.

Si precipita il liquido cosi ottenuto con acido tannico — i tannati cosi separati vengono estratti con alcool a bagno maria in apparecchio a ricadere per alcune ore. — L'alcool evaporato lascia un residuo molto denso, di colore giallo cupo, il quale ripreso con acqua dà un precipitato che si separa ancora per filtrazione. Il filtrato si presenta come uno sciroppo denso colorato in giallo bruno che corrisponde a quello con cui il PLUGGE fece i suoi esperimenti farmacologici. Questo residuo dà tutte le reazioni degli alcaloidi.

Col reattivo di MAYER si ha un precipitato bianco giallognolo abbondante ; con quello del BOUCHARDAT si ha un precipitato bruno

rosso ; con quello di ERDMANN un precipitato bianco giallognolo abbondante. Con l'acido tannico si ha un prec. pulverulento abbondante bianco giallognolo ; con l'acido picrico un prec. scarso ; col sublimato corrosivo un prec. biancastro amorfo. Il nitrato d'argento precipita la sostanza dando da prima un prec. biancastro che poi diventa di colore ruggine. L'acetato basico di piombo dà (come è descritto per la Cytisina) un precipitato bianco abbondante.

—

La sostanza da me ottenuta è tossica come risulta dalle seguenti esperienze :

ESPERIENZA I.

H. 11,25'. Inietto un cm^3 sotto cute ad una rana.
H. 11,27'. L'eccitabilità dell' animale appare diminuita ; sospesa per il capo lascia penzolare gli arti inferiori ; collocata sul dorso non riesce a prendere la posizione normale.
H. 11,45'. La sensibilita diminuisce netevolmente ; i movimenti volontari si fanno sempre più torpidi.
H. 11,50'. La rana non fa più alcun movimento spontaneo.
H. 12. Muore.

ESPERIENZA II.

Ripeto su altra rana con una dose metà della precedente :
H. 3,20'. Iniezione sotto cute : nulla di notevole tranne una lieve eccitabilita dell' animale fino alle ore 3.35.
H. 3,35'. I movimenti cominciano a diventare torpidi.
H. 3,40'. L'animale si muove malamente però collocato sul dorso ritorna nella posizione normale.
H. 3,50'. I movimenti attivi dell' animale sono quasi del tutto aboliti, cosicché se viene collocato sul dorso vi rimane ; la sensibilità e i riflessi tuttavia appaiono alquanto aumentati ; poiché basta toccare l'animale perché questo reagisca con forti scosse;
H. 4. La sensibilità incomincia a diminuire.
H. 4,5'. È quasi del tutto scomparsa, i movimenti volontari e i riflessi sono aboliti.
H. 4,45'. Morte.

Altre esperienze mi hanno dato lo stesso risultato. L'esame dei sintomi coi quali muoiono gli animali intossicati con l'alcaloide contenuto nei fiori della Sophora japonica, il metodo seguito nell' estrarlo, la presenza della Cytisina già dimostrata nei semi di questa pianta da altri autori, potevano facilmente far pensare che anche nel caso nostro si trattasse di Cytisina e che fosse questa l'alcaloide contenuto nei fiori. Per cercare di ottenerlo più puro onde sempre meglio identificarlo, ho pensato di trattare lo sciroppo da me ottenuto (e come ho già detto, corrispondente a quello esperimentato dal PLUGGE) con etere. La Cytisina è insolubile nell' etere; ma in questa sostanza potevano sciogliersi alcuni dei corpi che la rendevano impura ; trattai perciò in imbuto a spostamento 30 cm^3 del liquido sciropposo con etere e dopo prolungata agitazione, separai questo solvente dallo

sciroppo. Ma il liquido sciropposo, sottoposto ai saggi dell'alcaloide dava ancora tutte le reazioni positive, prova evidente che il nostro alcaloide, come la Cytisina, era insolubile in etere. Evaporai allora l'etere per constatare se qualche impurezza fosse stata separata da questo solvente e constatai che detto etere lasciava come residuo abbondanti cristalli, prismatici, piccolissimi, i quali si raggruppavano a guisa di mammelloni, o assumevano forme dendritiche come quelle qui raffigurate.

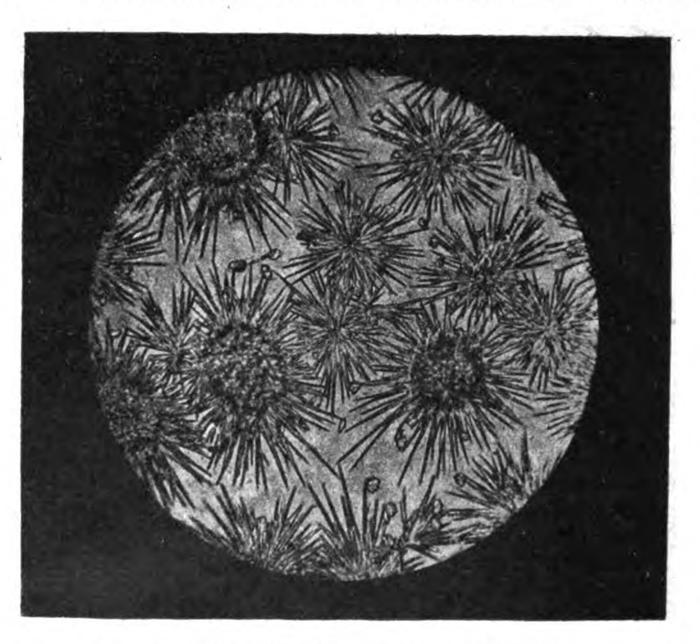


Fig. 1. — Cristalli del glucoside isolato dai fiori della Sophora japonica.

Fatta questa constatazione sono ritornato allo studio dell' alcaloide per determinare in modo definitivo se fosse o no Cytisina. Essendo questa sostanza solubile in cloroformio estrassi il liquido sciropposo, (già trattato con etere) con cloroformio, però senza alcun risultato. Questo fatto già di per sè esclude che l'alcaloide in parola sia Cytisina ed a questo risultato si giunge anche per il fatto che trattata un piccola quantità di sostanza col nitrobenzolo del commercio, non dà quella caratteristica colorazione violetta della Cytisina che è dovuta al dinitrotiofene che nel nitrobenzolo é contenuto.

Alcuni altri tentativi che io ho fatto per cercare di purificare e di isolare l'alcaloide non hanno condotto a risultati positivi data la quantità relativamente piccola di sostanza di cui disponevo.

Ho lasciato quindi per ora in disparte questa ricerca riportando la mia attenzione esclusivamente sulla sostanza cristallizzata che si separava dall' etere.

Ho preparato quindi più in grande, col metodo sopra indicato la

sostanza prima descritta ed ho potuto constatare che essa riduce il reattivo del Fehling e questa riduzione é molto più intensa :

1° Dopo trattamento a caldo della sostanza con acido cloridrico diluito.

2° Dopo di avere mescolato questa sostanza con l'emulsina che io ho potuto preparare estraendola dalle mandorle dolci e dopo averla lasciata per 24 ore in termostato.

—

La sostanza trattata col metodo di LASSAIGNE, non dà la colorazione caratteristica del bleu di prussia; indice questo che nel glucoside non vi é azoto.

Le osservazioni sopra esposte fanno dunque ragionevolmente pensare che noi siamo in presenza di un glucoside.

Che il metodo da noi seguito possa condurre all' estrazione oltre che di un alcaloide anche di un glucoside, non deve meravigliare sapendosi che molte volte si separano i glucosidi precipitandoli con acido tannico che li trascina con sè meccanicamente e che da questo precipitato possono poi essere separati con l'alcool come nel caso nostro.

Anzi il metodo da me seguito salvo poche varianti é quello che si adopera per l'estrazione dell' Arbutina, glucoside dell' Arbutus Unedo. Si poteva pensare che il glucoside da me ottenuto fosse la Rutina (Sophorina del FOESTER e W. STEIN) ma i saggi da me fatti dimostrano il contrario.

Per brevità riassumo in forma di tabella i caratteri differenziali che esistono fra le due sostanze che ho potuto facilmente rilevare, avendo a mia disposizione della Rutina, prima preparata nell' Istituto.

RUTINA.	SOSTANZA ESTRATTA DAI FIORI DI SOPHORA JAPONICA.
Sostanza amorfa gialla.	Sostanza cristallizzata in prismi a guisa di mamelloni ; incolori.
Poco tossica (Garino).	Notevolmente tossica.
Passa inalterata nelle urine.	Non si riscontra nelle urine.
Insolubile in acqua, solubile in soluzione lievemente alcalina con carbonato sodico.	Solubile in acqua, quasi deliquescente.
Col $FeCl_3$ assume una colorazione verde bruna intensa.	Col $FeCl_3$ colorazione rosso bruna.
Coll' acetato basico di piombo dà abbondante precipitato giallo aranciato e la soluzione resta colorata in giallo.	Niente.
Coll' acetato neutro di piombo si colora in giallo dando un precipitato che viene formandosi col tempo.	Nessun precipitato, nessuna colorazione.
L'HNO_3 del peso specifico 1,4 la colora in rosso aranciato.	Lievissimo color giallo.
L'H_2SO_4 la colora intensamente in giallo.	Niente.
La soluzione di argento ammoniacale dà una notevole riduzione.	Riduce pure.
Il reattivo del Fehling non viene ridotto.	Riduce notevolmente.
La sostanza è quasi insolubile in etere e cloroformio.	Solubile in etere e cloroformio

Dall' esame della tabella appare chiaro che il glucoside da noi isolato dai fiori della Sophora japonica non può essere Rutina. È forse un glucoside affine da cui la Rutina deriva o un prodotto di trasformazione di questo dovuto probabilmente alle diverse condizioni di vita della pianta.

Comunque sia questo glucoside che ho ottenuto cristallizzato allo stato di quasi assoluta purezza è tossico come lo dimostrano le esperienze seguenti.

ESEERIENZA I.

Si inietta ad un topo bianco 5 mg. di sostanza sciolta in un cm³ di acqua.

H. 4,40'. Iniezione sottocutanea.
H. 4,45'. I movimenti volontari sono alquanto torpidi e l'animale si muove stentatamente.
H. 4,48'. L'animale non riesce piu a trascinarsi. Respira frequentemente ; barcolla ; cade ; cerca di risollevarsi ; cade nuovamente. Dopo poco l'animale giace sul fianco e fa inutili sforzi per sollevarsi. La sensibilità è sempre conservata.
H. 4,55'. Movimenti clonici abbastanza intensi agli arti anteriori ; mentre i posteriori sono quasi o del tutto immobili.
H. 5. Cessano tutti i movimenti ; la sensibilità benchè alquanto diminuita, tuttavia esiste sempre.
H. 5,20'. La sensibilità è scomparsa.
H. 5,30'. Morte.

ESPERIENZA II.

H. 11. Iniezione sottocutanea di gr. 0,008.
H. 11,2'. Si manifesta una ipersensibilità.
H. 11,3'. La sensibilità comincia a diminuire ; i movimenti dell'animale cominciano a diventare torpidi.
H. 11,4'. L'animale barcolla, non riesce piu a reggersi sulle zampe, si trascina e si butta su di un fianco esistendo sempre, benchè alquanto diminuita, la sua sensibilità.
H. 11,6'. La sensibilità è scomparsa.
H. 11,8'. Morte.

Altre 10 esperienze fatte sui topi hanno condotto agli stessi risultati. Riferisco anche, come esempio, una delle tante esperienze da me fatte sulle rane.

H. 11. Inezione sottocutanea gr. 0,004.
H. 11,5'. L'animale è ipersensibile e appena toccato reagisce violentemente.
H. 11,18'. La sensibilità incomincia a diminuire, l'animale sospeso per il capo lascia penzolare gli arti interiori ; collocato sul dorso riesce con fatica a riprendere la posizione normale.
H. 11,20'. La sensibilità è ancora piu diminuita ; collocato sul dorso non riprende piu la posizione normale.
H. 11,23'. Abolizione completa della sensibilità e movimenti volontari e riflessi.
H. 11,25'. Morte.

Allo scopo di studiare un po' meglio l'azione fisiologica della sostanza da me isolata ho voluto ricercare l'azione esercitata sulla fermentazione ; sul sangue ; sulla pressione del sangue ; sul cuore ; sui muscoli e tronchi nervosi.

Riporto per brevità un esempio di ciascuna di queste esperienze.

Fermentazione : In due apparecchi di Einhorn metto una soluzione di glucosio al 2% ed una data quantità di lievito di birra. Ad uno di questi apparecchi aggiungo poi una soluzione di alcuni milligrammi

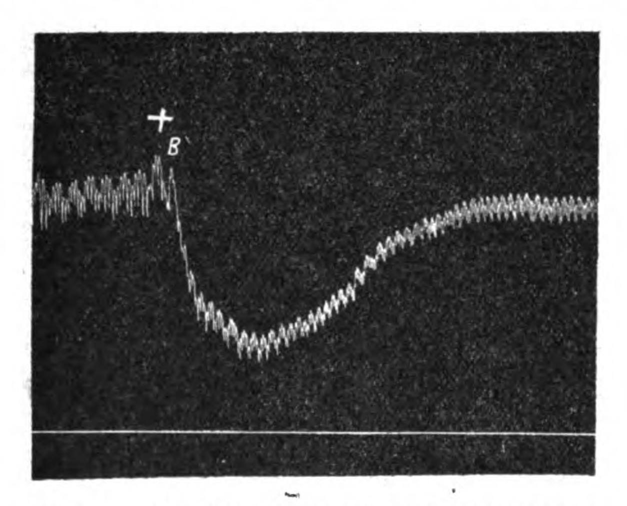


Fig. 2. — Tracciato della pressione del sangere in un coniglis dopo somministrazione del glucoside contenuto nei fiori della Sophora japonica.

del glucoside. I due apparecchi sono collocati in un termostato alla temperatura di 35°. Dopo sette ore si fa la lettura. Nell' apparecchio normale si trovano 6 cm³ di anidride carbonica ; mentre in quello che contiene la soluzione del glucoside se ne trovano soltanto 0.9 cm³.

Altre esperienze, simili a queste, permettono di concludere che il glucoside, se non impedisce, rallenta la fermentazione del glucosio per opera del lievito di birra che deve essere certamente danneggiato da questa sostanza.

Così si spiega come avendo io, in principio delle mie esperienze, cercato di liberare il decotto dei fiori dagli zuccheri fermentescibili con l'aggiunta di lievito di birra, non mi è riuscito ad avere che un limitatissimo sviluppo di anidride carbonica, nonostante che il liquido abbia dato sempre una fortissima riduzione del Fehling.

Azione sul Cuore. Ho esperimentato piu volte sul cuore di rana, messo allo scoperto, e lasciandovi cadere sopra alcune goccie della sostanza venefica. Colle pinze cardiografiche del Marey ho potuto

anche ottenere alcuni tracciati dai quadi risulta che sotto l'azione di questo veleno il cuore rallenta i suoi battiti e che essi ben presto diventano periodici finchè il cuore si arresta completamente in posizione sistolica.

PRESSIONE DEL SANGUE. Per queste esperienze mi sono servito di cani e conigli ai quali ho iniettato endovenosamente la sostanza venefica da me separata.

In conseguenza di questa iniezione si può constatare, come si rileva dal tracciato che qui unisco, una rapida diminuzione della pressione, per altro di breve durata.

Col ripetersi dell' inezione si ripete anche il fenomeno nell' identico modo.

AZIONE SUI MUSCOLI E TRONCHI NERVOSI. In quanto ai muscoli pare che il veleno non abbia sugli stessi azione spiccata ; come risulta da ripetute esperienze, fatte sul muscolo di rana, bagnato colla sostanza.

Anche i tronchi nervosi ripetutamente bagnati colla sostanza hanno dimostrato che la conducibilità non è per nulla modificata in quanto che il muscolo eccitato per il tramite del nervo si contrae regolarmente.

Queste esperienze dovrebbero essere estese ed il quadro tossicologico dovrebbe essere ancora piu minutamente studiato ; ma questo si potrebbe fare soltanto se si disponesse di grande quantità di sostanza. In questo caso sarebbe anche possibile determinare la formula centesimale del glucoside e dimostrare così se esso sia veramente nuovo, come è possibile, o se si tratti di un' altra sostanza già conosciuta. Se tutto ciò è possibile per l'abbondanza del materiale, non lo è, d'altra parte, in questi tempi anormali, per l'elevatissimo prezzo dell' alcool, etere e cloroformio e degli altri solventi che per un' operazione su vasta scala dovrebbero essere adoperati in grandissima quantità.

Sperando di poter in altri momenti piu propizï condure a termine queste ricerche, è permesso intanto, da quello che si è detto fin qui, venire alle seguenti conclusioni :

I. I fiori della Sophora japonica contengono un alcaloide che per le sue reazioni si dimostra diverso dalla Cytisina, la quale, come è noto, è contenuta nei semi di questa pianta.

II. I fiori di Sophora japonica contengono pure una sostanza di natura glucosidica, diversa dalla Rutina (Sophorina che il FOESTER ed il WACHS avevano isolato da questa pianta.)

III. La sostanza isolata che si presenta bene cristallizzata a differenza della Rutina amorfa, è tossica. Alla dose di 2-5 milligrammi

uccide i topi e rane con fenomeni di progressiva paralisi. -- Produce rallentamento dei battiti del cuore che poi si arresta in posizione sistolica, ed abbassa temporaneamente la pressione del sangue. Non ha azione sulla contrattilità muscolare e sulla conducibilità nervosa.

—

CONCLUSIONS.

I. Les fleurs de la Sophora japonica contiennent un alcaloïde qui par ses réactions se démontre différent de la Cytisine, laquelle, comme on sait, est contenue dans les graines de cette plante.

II. Les fleurs de la Sophora japonica contiennent aussi une substance de nature glucosidique différente de la Rutine (Sophorine que FOESTER et WACHS avaient isolée de cette plante).

III. La substance isolée qui se présente bien cristallisée, différemment de la Rutine amorphe, est toxique. En quantité de 2 ou 5 milligrammes, tue les rats et les grenouilles avec phénomènes de paralysie progressive. Elle produit un ralentissement des battements du cœur, qui après s'arrête en position systolique; elle abaisse temporairement la pression du sang.

Elle n'a aucune action sur la contractilité musculaire et sur la conductibilité nerveuse.

———

LABORATOIRE DE PHYSIOLOGIE DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE D'AGRICULTURE ET DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE. — RIO DE JANEIRO.

Sur la section physiologique des nerfs par la novocaïne,

par le professeur

MIGUEL OZORIO DE ALMEIDA.

Après la découverte de l'action anesthésique locale de la cocaïne, deux théories se sont formées pour expliquer cet effet : l'une admettait que la cocaïne a une action spécifique sur les terminaisons sensitives, l'autre n'acceptait pas cette spécificité d'action et établissait l'effet général de cette substance. D'après cette seconde théorie, la cocaïne agirait sur toute sorte de protoplasma vivant, tandis que pour la première théorie elle serait un véritable *curare sensitif*.

La théorie du curare sensitif a été presque complètement abandonnée devant les résultats des recherches faites par plusieurs auteurs (U. MOSSO, FRANÇOIS-FRANCK, DANILEWSKI, CHARPENTIER, etc). On a pu démontrer l'action de la cocaïne non seulement sur les terminaisons nerveuses sensitives, mais aussi sur les troncs nerveux, sur le système nerveux central, sur les muscles et les glandes, et enfin sur des éléments moins différenciés, comme les cellules épithéliales vibratiles, les globules blancs du sang, le protoplasma végétal, les microbes, etc.

Parmi tous les effets de la cocaïne, un des plus intéressants pour le physiologiste, à côté de l'action analgésiante, est l'interruption de la conductibilité des troncs nerveux. Ceux-ci mis directement en contact avec des solutions de chlorhydrate de cocaïne perdent leur conductibilité au bout d'un temps relativement court ; par la résorption de la cocaïne cette conductibilité se rétablit entièrement. Cette section physiologique des nerfs, étudiée d'abord pour être appliquée à la pratique de l'anesthésie régionale (CORNING, OBERST, FEINBERG), a été l'objet de recherches plus précises de U. MOSSO (1), et surtout de FRANÇOIS-FRANCK (2). Ce dernier a démontré que la section physiolo-

(1) U. MOSSO : Action physiologique de la cocaïne et critique expérimentale des travaux publiés sur son mécanisme d'action. *Arch. Ital. Biol.*, 1901, XIV.

(2) FRANÇOIS-FRANCK : Action paralysante locale de la cocaïne sur les nerfs et les centres nerveux. *Arch. de Physiol.*, 1892.

gique des nerfs est complète, c'est-à-dire porte sur toutes les formes d'excitation que peut conduire un tronc nerveux. Cet effet est très net dans un nerf mixte et complexe comme le pneumogastrique. L'interruption de la conductibilité des nerfs mixtes ne se fait pas simultanément pour les formes différentes du courant nerveux. Les excitations sensitives sont abolies avant les motrices. W. E. DIXON a démontré que, dans les pneumogastriques, les fibres nerveuses à conduction ascendante sont paralysées avant les fibres à conduction descendante (1).

La cocaïne tend à être de plus en plus remplacée par d'autres produits préparés industriellement et présentant sur elle certains avantages (solubilité, moindre altérabilité des solutions, moindre toxicité, etc.). Le nombre de ces produits s'est considérablement accru. L'étude complète de leur action physiologique n'a pas toujours été faite avec le même soin que celle de la cocaïne. Ce qu'on chercha surtout c'est l'action analgésique, et celle-ci une fois dûment constatée, et une fois vérifié aussi le degré de toxicité, le produit est lancé. Dans la plupart des cas on est porté à attribuer à ces substances les propriétés générales de la cocaïne. Lorsqu'on parcourt les travaux publiés sur l'une d'elles, on est surpris de constater quelquefois des lacunes considérables, à côté de points non définitivement établis, les résultats des recherches faites étant franchement contradictoires.

La section physiologique des nerfs par la novocaïne est un de ces points. A l'occasion de la découverte de cette substance, son étude pharmacologique a été faite à Breslau par BIBERFELD. D'après les résultats communiqués à BRAUN (2), dans 10 minutes en solution à 0,25 p. 100, elle anesthésie les troncs nerveux mis à nu. Dans ses recherches sur l'action de la novocaïne sur le nerf sciatique de la grenouille, A. LÄWEN (3) a trouvé qu'après une heure d'action, l'excitabilité du nerf est à peine réduite de 46 p. 100 de sa valeur primitive. D'autre part, les travaux de PIQUAND et DREYFUS (4) ont montré que l'enveloppement du nerf sciatique de la grenouille par des solutions de novocaïne aboutit à l'abolition des réflexes normalement produits par l'excitation de la patte. La novocaïne interromprait donc la conduction des excitations sensitives par le tronc nerveux. OSKAR GROS (5) a

(1) W. E. DIXON, The selective action of cocaïne on nerve fibres. *Journ. of Physiol.*, 1904, XXXII.

(2) A. BRAUN : Ueber einige neue örtliche Anaesthetica (Stovain, Alypin, Novocain). *Deutsch. med. Wochenschr.* 1905, p. 1667.

(3) A. LÄWEN : Vergleichende Untersuchungen ueber die örtliche Wirkung von Kokain, Novocain, Alypin, und Stovain auf motorische Nervenstämme. *Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm.*, 1907, LVI, p. 138.

(4) G. PIQUAND et L. DREYFUS : Recherches sur quelques anesthésiques locaux *Journ. de Physiol. et Pathol. générale*, 1910, p. 70.

(5) OSKAR GROS : Ueber Narkotica und Lokalanästhesia. *Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm.*, 1912, LXVII, p. 126.

fait une étude comparative de l'action des différents sels de novocaïne, en trouvant qu'ils sont d'autant plus actifs qu'ils sont plus hydrolysés. DÉRIAUD et LAUGIER (1), employant la technique précise antérieurement imaginée pour les recherches pharmacologiques sur les nerfs (2), ont suivi les altérations de l'excitabilité du sciatique de grenouille sous l'action de la syncaïne. Comme pour la cocaïne, la rhéobase croît et la chronaxie diminue. Mais pour la syncaïne l'action est plus intense, exigeant, pour qu'on puisse bien suivre les altérations de l'excitabilité, des solutions plus étendues. A la concentration de 0,75 p. 1000 les altérations sont trop rapides.

Enfin, dans un travail récent, FULTON est arrivé à des résultats contraires à la section physiologique des nerfs par la novocaïne (3). En procédant à la diazotisation de cette substance par la métaphénylènediamine, il a obtenu un produit qu'il a appelé *novocaïne brown*, qui a une action identique à celle de la novocaïne. FULTON, en se basant sur des considérations théoriques et sur quelques résultats expérimentaux, pense que la novocaïne n'agit que sur les noyaux des cellules.

Les troncs nerveux, dont les fibres conductrices sont dépourvues de noyaux, échapperaient à son influence. En effet, dans ses expériences, il n'a vu aucun changement dans la conductibilité du sciatique de grenouille immergé dans une solution de novocaïne à 5 p. 100. Si, au lieu de mettre l'anesthésique exclusivement en contact avec le nerf, il plongeait toute la préparation neuro-musculaire dans la solution, au bout de quelque temps les excitations indirectes étaient inefficaces ; cependant le muscle se contractait encore lorsqu'il était directement excité. FULTON conclut de ce fait que la novocaïne a une action franchement curarisante. Pour expliquer l'action anesthésique il admet qu'elle agit sur les terminaisons sensitives. La novocaïne serait ainsi un curare moteur et sensitif.

Voilà rapidement résumé l'état de la question. Devant toutes les incertitudes et, ayant eu besoin d'employer la novocaïne dans des expériences de section physiologique des pneumogastriques, nous avons fait une série de recherches, dont les résultats forment une contribution à l'étude du problème. Nous voulons les exposer dans ce travail. Les résultats d'une première série de recherches faites par nous ont déjà été sommairement exposés (4) sans indication de technique.

(1) R. DÉRIAUD et H. LAUGIER : Action comparée du chlorhydrate de cocaïne et de la syncaïne sur l'excitabilité. *Soc. de Biol.*, 16 juillet 1921.

(2) H. LAUGIER : Chambre à excitation pour l'étude des actions pharmacologiques. *Soc. de Biol.*, 16 juillet 1921.

(3) J. F. FULTON : Studies on neuro-muscular transmission. I. The action of novocaine on nuclei. *Amer. Journ. of Physiol.*, 1921, LVII, 153.

(4) M. OZORIO DE ALMEIDA : Sobre a morte da cobaya consecutiva à dupla vagotomia. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1920, XII, p. 5.

Nous avons dernièrement repris la question et mené à bout une nouvelle série dont les résultats sont beaucoup plus complets, tout en confirmant les faits que nous avions exposés.

Pour établir qu'un anesthésique local a une action sur les troncs nerveux il faut essayer cette action sur différentes espèces de nerfs. On sait, en effet, que cette action est variable dans son intensité suivant la nature des excitations conduites par le nerf considéré. Pour le cas de la novocaïne les recherches sur les nerfs sensitifs ont donné des résultats à peu près concordants. Pour les nerfs moteurs, l'accord n'existe pas.

L'action de cette substance sur le nerf pneumogastrique n'a pas été de la part d'autres auteurs, à notre connaissance, l'objet de recherches spéciales. Dans notre étude nous avons pris tous ces points en considération, en insistant naturellement plus sur les points non abordés ou encore en litige.

Nous diviserons donc l'exposé de nos recherches en quelques chapitres, et nous indiquerons, à propos de chacun des points, les conditions de technique. Il nous semble, en effet, que les divergences de résultats obtenus par quelques auteurs peuvent être expliquées, tant qu'on peut le supposer, par des défauts de technique.

I. — *Action de la novocaïne sur la conduction des excitations sensitives ou réflexes.* — Ce point était le moins intéressant à étudier de nouveau. Comme nous l'avons vu, il n'y a pas de divergences sérieuses, parmi les auteurs, qui admettent, en se fondant sur l'expérimentation physiologique et sur les observations cliniques, qu'il y a une abolition complète de la conductibilité des excitations sensitives. Les résultats de DREYFUS et PIQUAND sont, à ce point de vue, très clairs. Aussi nous nous sommes simplement borné à quelques recherches de vérification.

Nos expériences ont été faites sur des grenouilles à moelle sectionnée. Le nerf sciatique d'un côté était isolé et enveloppé par une petite gouttière en caoutchouc enfermant de l'ouate imbibée dans une solution de novocaïne à 2 p. 100. Au bout de 15 minutes à peu près, les réflexes provoqués par des pincements ou par d'autres formes d'excitation étaient abolis du côté anesthésié, pendant qu'ils étaient conservés du côté intact. La novocaïne abolit donc la conduction des excitations sensitives et réflexes.

II. — *Action de la novocaïne sur la conduction des excitations motrices.* — C'est cette question qui a soulevé le plus de doutes. Nous avons vu que quelques auteurs ne croient pas, d'après leurs expériences, que la novocaïne puisse couper physiologiquement les nerfs moteurs. Lorsque, dans une question de fait, il y a des divergences

aussi marquées, c'est évidemment que les conditions de travail ne sont pas identiques, et qu'il y a des causes d'erreur peut-être insuffisamment connues.

Dans les recherches sur l'action de la novocaïne sur les nerfs moteurs de grenouille, il nous semble que deux points fondamentaux n'ont pas été bien éclairés. D'une part aucune précaution n'a été prise, ou du moins les mémoires de LÄWEN et de FULTON ne nous disent rien sur ce point, pour éviter les effets de diffusion physique du courant électrique ; d'autre part, on n'a pas tenu suffisammen-compte des altérations de la préparation neuro-musculaire indépent dantes de l'action anesthésique proprement dite et qui peuvent troubler la netteté des résultats

A côté de ces points il y a encore lieu d'envisager la question du temps d'action de la novocaïne. Dans les recherches de LÄWEN et de FULTON ce temps a été insuffisant.

La première question est la plus grave. LÄWEN a employé, pour faire l'essai de la conductibilité des nerfs sciatiques de grenouille, des excitations électriques fournies par un appareil à induction. Les courants faradiques ont été aussi choisies, d'après un court passage de son travail, par FULTON. Or, on sait bien, mais ce fait paraît avoir été oublié par quelques physiologistes modernes qui ne se font pas une spécialité de l'exitation des nerfs, que les bobines à induction comme le chariot du type DU BOIS-REYMOND, peuvent donner lieu à la production de certains phénomènes, dont l'intervention dans une expérience peut rendre inutiles tous ses résultats. Ce sont les *phénomènes unipolaires d'induction*. Nous ne les décrirons pas ici, en renvoyant le lecteur qui voudrait avoir une idée complète sur cette question à quelques travaux où l'on rencontre des indications bibliographiques suffisantes (1)

Lorsqu'on arrive, avec un courant d'induction à une tension un peu élevée, le courant excitateur peut ne pas rester limité à la région du nerf comprise entre les électrodes excitateurs. Il peut se diffuser par toute la préparation, en amenant une contraction du muscle par excitation directe. Ces effets sont très bien mis en évidence, en liant le nerf entre le point excité et le muscle. Les excitations nerveuses physiologiques ne sont plus transmises au muscle ; cependant en rapprochant suffisamment les deux bobines l'une de l'autre de l'appareil de DU BOIS-REYMOND on obtient des contractions musculaires. Ces phénomènes, qui peuvent être produits avec un seul pôle de la bobine secondaire, l'autre restant ouvert, d'où leur nom *d'effets unipolaires d'induction*, se produisent plus facilement lorsque la préparation est

(1) DU BOIS-REYMOND : *Untersuchungen über thierische Elektricität*, vol. I. BIEDERMANN : *Elektrophysiologie*, vol. II. B. DANILOWSKY : *Die physiologischen Fernwirkungen der Elektricität* 1902

reliée, d'une manière ou d'autre, au sol ou à un conducteur d'une grande capacité. L'isolement complet de la préparation, quoique rendant leur production plus difficile et exigeant des tensions de courant plus grandes, ne les supprime pas entièrement. Aucune précaution ne peut les éviter d'une manière décisive. Il n'y a qu'un moyen : c'est d'être prévenu de leur existence et contrôler chaque résultat expérimental par des moyens qui doivent varier avec les conditions particulières de chaque genre de recherches. En prenant le cas particulier de l'action de la novocaïne, on comprend aisément que, sous l'action de l'anesthésique, l'excitabilité et la conductibilité du nerf diminuent progressivement. Le seuil d'excitation croît, et l'expérimentateur augmente l'intensité du courant en approchant de plus en plus les bobines du chariot de DU BOIS-REYMOND. Il arrive un moment où les échappements physiques du courant se produisent, sans que rien annonce ce phénomène. Le nerf est incapable de conduire, est sectionné, et cependant on obtient toujours des contractions musculaires. La conclusion d'une telle expérience sera évidemment erronée.

L'autre cause d'erreurs dont nous avons parlé plus haut s'est montrée à nous, dans quelques expériences, comme pouvant aussi mener à des conclusions fausses. Quelquefois, le nerf étant enveloppé par la solution de novocaïne, dans sa partie moyenne, l'excitation faite à côté de la surface de section était inefficace, tandis que faite dans un point plus proche de la zone anesthésiée, elle était capable de produire des contractions musculaires. On sait qu'avec le temps, l'excitabilité du nerf sectionné présente des altérations, et il ne faut pas confondre ces altérations avec l'effet de la substance étudiée.

Nos expériences ont été faites à des époques différentes et avec des techniques diverses, suivant les exigences que nous nous imposions. Au début nous nous sommes servi exclusivement des courants galvaniques, avec lesquels il n'y a pas lieu de craindre les effets unipolaires. Nous remarquerons, seulement pour mémoire, qu'il faut, même avec cette sorte de courants, éviter la formation de circuits dérivés dans la préparation neuro-musculaire ; quelquefois, le nerf étant par sa partie moyenne suspendu sur les électrodes, si le bout touche la plaque de liège mouillée par du sérum physiologique et rendue ainsi conductrice d'électricité, on peut avoir des résultats érronés.

Dans notre première série de recherches comprenant 7 expériences faites en 1919, nous avons toujours obtenu une section physiologique complète du nerf sciatique de la grenouille par la novocaïne. Le temps nécessaire pour arriver à ce résultat a varié de 18 à 36 minutes. La récupération de la conductibilité nerveuse après le lavage du nerf par la solution physiologique n'a pas été constante. Nous avons

aussi dans cette première série assayé l'action de la stovaïne ; comme la novocaïne cette substance s'est montrée très efficace, en produisant l'interruption complète de la conduction des excitations motrices. Les titres des solutions employées a varié de 1 à 3 p. 100.

Dans notre nouvelle série d'expériences nous avons adopté une technique beaucoup plus complète. Les préparations neuro-musculaires étaient fixées sur une plaque de liège et placées dans une chambre humide dont la température pouvait être modifiée suivant les circonstanees. Le nerf de chaque préparation était dans sa partie moyenne enveloppé par deux petites gouttières en caoutchouc, enfermant de l'ouate imbibée de la solution anesthésique. Il reposait sur deux paires d'électrodes, l'une placée entre la région anesthésiée et le muscle et l'autre au-delà de cette région. Par un jeu très simple de commutateurs et d'interrupteurs, on pouvait faire les excitations tantôt par des courants faradiques, tantôt par des courants galvaniques. Les premières étaient fournies par un petit chariot de DU BOIS-REYMOND. Les courants galvaniques étaient réglées dans leur intensité par un monocorde de DU BOIS-REYMOND. Nos indications d'intensité pour ces courants seront données par les distances du curseur de l'appareil à la borne initiale, l'intensité pouvant varier de 0 à 105.

En employant en même temps deux préparations neuro-musculaires de la même grenouille, on pouvait faire des expériences comparatives sur les titres des solutions, la nature du solvant, etc. Les grenouilles dont nous nous sommes servi étaient toutes des *Leptodactylus ocellatus*, l'espèce qui est à notre disposition à Rio de Janeiro.

Dans les conditions de l'expérience il nous a été facile de voir à quelle distance des deux bobines du chariot à induction commencaient les effets unipolaires. Quelquefois ces effets se révelaient d'une manière très simple : on obtenait non seulement une contraction du muscle de la préparation excitée, comme aussi une secousse du muscle de la préparation voisine, ce qui prouvait la diffusion physique du courant électrique. Toute excitation faite avec des intensités au-dessus de celle-ci était suspecte et on contrôlait soigneusement les résultats.

TABLEAU I.

EXPÉRIENCES.	Titre de la sol. p. 100.	Nature du solvant	Température	Temps nécessaire pour produire la sect physiol.	Temps de récupération de la conduction.	Observations.
I	10	eau		15 min		
II	10	sol. phys.	14°	Il n'y a pas eu de section en 2 heures.		

Expériences.		Titre de la sol. p. 100	Nature de solvant	Température	Temps nécessaire pour produire la sect. physiol.	Temps de récupération de la condition.	OBSERVATIONS.
III	Prép. I	10	sol. phys.	20°	76 min.	45 min.	
	Prép. II	10	eau	20°	33 min.	1 heure	
IV	Prép. I	10	eau	20°	36 min.	1 h. 5'	
	Prép. II	1	eau	20°	44 min.	10 min.	
V	Prép. I	10	sol. phys.	23°	14 min.	négative	
	Prép. II	10	eau	23°	24 min.	négative	
VI	Prép. I	10	eau	20°	33 min.	35 min.	
	Prép. II	1	eau	20°	55 min.	28 min.	
VII	Prép. I	10 (réc.)	eau	20°	1 h. 41'	1 h. 5'	
	Prép. II	10 (anc.)	eau	20°	2 h. 14'	négative	
VIII	Prép. I	15 (réc.)	eau	25°	22 min.	négative	
	Prép. II	5 (anc.)	eau	25°	25 min.	négative	
IX	Prép. I	5	eau	25°	1 h. 7'	37 min.	Après le lavage, les nerfs restent plongés dans la sol. phys.
	Prép. II	0,5	eau	25°	1 h. 40'	10 min.	
X	Prép. I			24°			Témoin
	Prép. II	2	eau	24°	négative		
XI	Prép. I		-	20°		-	Témoin
	Prép. II	2	eau	20°	45 min.	négative	
XII	Prép. I	2	eau	15°	18 min.	négative	
	Prép. II	2	eau	25°	23 min.	négative	
XIII	Prép. I	2	eau	16°	21 min		
	Prép. II	2	eau	27°	1 h. 23'	-	

Nous avons réuni dans le tableau I les résultats de nos expériences. En étudiant ce tableau, on peut voir que deux des expériences ont donné des résultats négatifs. Au bout de deux heures d'action de la novocaïne, le nerf conduisait encore. Cette conductibilité s'est considérablement réduite cependant, et la formule d'excitation a montré des altérations. Dans toutes les autres expériences les résultats ont été positifs ; la section physiologique du nerf s'est faite complètement.

Il faut remarquer que le temps pour obtenir cet effet est essentiellement variable (de 14 minutes à 2 heures 14 minutes), et qu'il est un peu difficile de connaître exactement les raisons de ces variations. Nous tâcherons cependant de dégager le sens général des phénomènes.

La nature du solvant ne semble pas avoir une action directe. Dans une expérience (III), la novocaïne dissoute dans du sérum physiologique a agi plus lentement que celle dissoute dans de l'eau, mais dans l'autre (V) on a constaté le contraire. L'âge de la solution paraît affaiblir un peu son pouvoir. Cet affaiblissement est cependant presque négligeable, du moins lorsque la solution n'est pas trop vieille et ne présente pas des signes visibles d'altération. Dans l'expérience VIII, la solution employée était préparée depuis 51 jours ; le temps nécessaire pour l'action a été presque égal à celui de la solution récente. Dans l'expérience VII les différences ont été plus marquées.

Le titre des solutions a une certaine importance Les solutions concentrées, toutes les autres conditions étant égales, agissent plus vite que les solutions diluées. C'est ce que découle des expériences IV, VI et IX. Quoique nous n'ayons pas cherché quel est le maximum de dilution compatible avec une action nette, remarquons que la solution à 0,5 p. 100 s'est montrée active.

L'action de la température n'est pas très nette. Cependant dans les expériences XII et XIII, dans lesquelles on a étudié cette influence, on peut remarquer que l'élévation de la température a produit un certain retard dans l'action de la novocaïne. Le nombre et la nature des expériences ne permettent pas encore une conclusion définitive.

Dans les expériences X et XI nous avons cherché à faire une comparaison entre les altérations spontanées de l'excitabilité du nerf et les altérations produites par la novocaïne. Dans l'expérience X, quoique la section complète n'ait pas été obtenue, la réduction de la conductibilité a été beaucoup plus considérable que pour le nerf témoin. Dans l'expérience XI les résultats sont des plus nets. Nous les exposons dans le tableau II, en rappelant que pour les courants faradiques l'intensité est d'autant plus forte que les nombres exprimant la distance des bobines sont moindres, le contraire s'observant, dans notre cas, pour les courants galvaniques

TABLEAU II.

	Au début de l'expérience				A la fin de l'expérience.			
	Excitation au-dessus de la zone anesthésiée.		Excitation au-dessous de la zone anesthésiée.		Excitation au-dessus de la zone anesthésiée.		Excitation au-dessous de la zone anesthésiée.	
	C. far.	C. gal.	C. far.	C. gal.	C. far.	C. gal.	C. far	C. gal.
Nerf inclus dans la novocaïne.	17.6	3	17	2	4.7*	rien	10.3	17
Nerf témoin	17.6	2	15.4	12.3	15.8	4.5	14.1	5

Une dernière question est relative à la récupération de la conductibilité du nerf lorsque la novocaïne est retirée et le tronc nerveux abondamment lavé par du sérum physiologique. Les résultats de nos expériences sont très variables. Dans quelques unes il n'y a eu aucun rétablissement de la conduction, dans d'autres ce rétablissement a été rapide. Dans les conditions expérimentales cette variabilité est très compréhensible. En effet, le nerf étant détaché de l'organisme, la diffusion et la résorption de la novocaïne ne peut pas se faire comme il arrive pour les nerfs laissés en place. Dans les conditions de nos expériences le rétablissement de la conductibilité doit se faire d'une manière variable dépendante des conditions du lavage.

III. — *Section physiologique des pneumogastriques par la novocaïne.* — Comme l'a bien pensé FRANÇOIS-FRANCK, le nerf pneumogastrique convient très bien à l'étude de l'action anesthésiante des substances du type de la cocaïne. En 1919, comme préparation à une série de recherches sur la mort produite par la vagotomie chez le cobaye, nous avions vérifié que la novocaïne, aussi bien que la stovaïne, abolissent la conduction de toutes les formes d'excitation qui peuvent parcourir les vagues. Nous avons repris maintenant ces expériences en les variant et nous avons pu confirmer ces résultats.

La plupart du temps nos expériences ont été faites sur le chien, le lapin étant employé parfois. En enveloppant les pneumogastriques par la novocaïne, d'après une technique semblable à celle que nous avons déjà décrite, on observe les phénomènes que nous allons à décrire.

(*) Contraction par effet unipolaire.

La respiration présente les mêmes modifications qu'on connait déjà pour le cas de la section faite par les ciseaux (section chirurgicale). Dans certains cas, ces modifications, comme aussi pour la section chirurgicale, sont réduites à un minimum : on remarque simplement une diminution légère de la fréquence compensée par une augmentation de l'amplitude des mouvements sans altérations marquées de la forme ou de la durée relative des phases de la respiration. Dans la plupart des cas, cependant, les modifications sont plus graves ; elles ne sont pas uniformes. Il peut y avoir une arythmie complète, ou bien changement du rythme normal, l'inspiration étant très prolongée et l'expiration brusque, ou encore des pauses inspiratoires prolongées.

Du côté de la circulation on voit toujours, chez le chien, une accélération considérable des battements cardiaques.

Lorsqu'on excite par des courants faradiques les pneumogastriques au-dessus de la zone enveloppée par la novocaïne, on observe les altérations de la respiration, mais la pression artérielle reste inaltérée. Les fibres cardio-inhibitrices sont donc paralysées. Pour constater l'interruption de la conduction des excitations respiratoires, nous avons employé un procédé très simple : au lieu de faire des excitations du tronc nerveux lui-même, ce qui donne parfois des résultats peu nets, nous pratiquions des insufflations des poumons pour produire les arrêts respiratoires étudiés et connus depuis HERING et BREUER. Ces pauses réflexes se font par la voie des pneumogastriques; en effet, elles disparaissent par la vagotomie. Chez les animaux dont les vagues sont enveloppés par la novocaïne les pauses de HERING et BREUER ne se montrent jamais. Il n'y pas conduction des excitations réflexes venues des poumons.

Nous avons fait des expériences semblables avec la stovaïne. Cette substance a, dans tous les cas, produit une section complète des vagues. Pour le cas des pneumogastriques, il est très facile de constater le rétablissement complet de la conduction nerveuse après le lavage du nerf. Ce rétablissement est rapide. Il est très facilité par la circulation du nerf et par le contact avec les autres tissus et avec les liquides de l'organisme.

La novocaïne a donc le pouvoir de couper physiologiquement les nerfs pneumogastriques, en interrompant d'une manière complète la conduction de toute sorte d'excitations le long de ces nerfs.

CONCLUSIONS.

1. — L'étude de la question de la section physiologique des nerfs par la novocaïne est encore très incomplète, et n'a pas donné des résultats concordants.

2. — La novocaïne interrompt la conduction des excitations sensitives ou reflexes.

3. — Cette substance empêche la conduction des excitations motrices.

4. — Elle produit une section physiologique totale d'un nerf mixte et complexe comme le pneumogastrique.

5. — La section physiologique des nerfs par la novocaïne est, dans les conditions normales, essentiellement transitoire. Par la diffusion ou la résorption de l'anesthésique, la conductibilité se rétablit.

6. — L'action de la novocaïne ne peut donc s'expliquer par une action curarisante ou une influence spécifique sur les terminaisons sensitives. Son action se fait sentir aussi sur les troncs nerveux, dont la conductibilité est complètement abolie sous toutes ses formes.

ISTITUTO DI MATERIA MEDICA E DI FARMACOLOGIA SPERIMENTALE
DELLA R. UNIVERSITÀ DI MODENA
DIRETTO DAL PROF. RICCARDO LUZZATTO

Lesioni disseminate del sistema nervoso nell'avvelenamento per una base grassa non satura (*)

Ricerche del

PROF. RICCARDO LUZZATTO E DOTT. ANGELINA LEVI

(con quattro tavole)

Fino dal 1914 l'attenzione di uno di noi (1) fu intensamente rivolta alla studio delle azioni e del comportamento nell'organismo animale, di una base di composizione chimica assai semplice, la vinilamina.

Se le azioni di questa sostanza ci sembrarono così interessanti da farci ritenere che valesse la pena di eseguire con essa numerosissime esperienze, che in parte vennero pubblicate (1) in parte formano oggetto della presente comunicazione, ciò dipese innanzi tutto da due considerazioni:

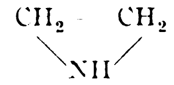
1° L'essere noto in base agli studi di EHRLICH (2) di LEVADITI (3) e di altri ancora, che la vinilamina dà luogo a necrosi tipica della papilla renale, mentre il resto del tessuto renale e specialmente la corticale non presentano alterazioni degne di nota; II° dal risultare dalle ricerche dei citati autori, che in rapporto alle azioni tossiche la vinilamina presenta un comportamento che sta, si può dire di mezzo, tra quello tipico di sostanze chimicamente assai complesse quali le tossine e quello dei comuni alcaloidi. Infatti nell'azione della vinilamina occorre, perchè si manifestino i fenomeni tossici, un periodo di tempo più o meno lungo prima che scoppi il quadro caratteristico, a differenza di quanto si osserva con la massima parte degli alcaloidi,

(*) Gli AA. comunicarono i risultati di queste ricerche alla Soc. Med. Chirurg. di Modena nella seduta del febbraio 1921 e al Congresso per il Progresso delle Scienze tenutosi in Trieste nel settembre 1921.

In dette occasioni vennero fatte dimostrazioni di pezzi anatomici e preparati microscopici relativi.

i quali, somministrati in dosi sufficienti danno luogo, si può dire subito dopo il loro assorbimento, al quadro tossico loro proprio.

Questo periodo di incubazione che può essere di qualche ora ed anche di un giorno, viene interpretato dal LEVADITI, ammettendo che le azioni tossiche della vinilamina siano dovute all' intimo e fisso legame che si stabilisce fra essa e determinati tessuti, legame molto più stabile di quello che ha luogo coi comuni alcaloidi, i quali non vengono mai a far *stabilmente* parte della costituzione intima del protoplasma cellulare, tanto che è possibile, almeno in generale, ritrovarli più o meno modificati nei prodotti di secrezione a meno che, non vengano scomposti completamente nell'organismo. Se nello stabilirsi di questo legame, la vinilamina si comporti come sostanza « sostitutiva » o semplicemente « aggiuntiva » non è noto. Perchè si stabilisca il legame tra protoplasma di determinati tessuti e vinilamina, occorre un certo tempo, come si osserva per lo svolgersi dell'azione delle tossine. Nonostante si tratti di molecola straordinariamente semplice C_2H_5N, non è stata ancora detta l'ultima parola intorno alla costituzione della vinilamina la quale, secondo gli importanti studi del GABRIEL (4) avrebbe realmente la costituzione di vinilamina ossia : $CH_2{=}CH{-}NH_2$, mentre secondo il MARCKWALD (5) ed altri si tratterebbe di dimetilenimina ossia :



Ricordiamo brevemente che uno di noi nelle esperienze eseguite parecchi anni fa e estesamente riportate (I), oltre a confermare quanto altri avevano osservato intorno all'azione della vinilamina sui reni, oltre a studiare intimamente il comportamento della vinilamina e di alcuni suoi derivati nell'organismo animale, richiamò l'attenzione, molto più di quello che fosse stato fatto dagli altri autori, sulle azioni tossiche intensissime che questa sostanza esplica sul sistema nervoso. Forse il singolare reperto della necrosi della papilla renale, aveva attratto così intensamente l'attenzione di un grande osservatore quale l'EHRLICH, da fargli ritenere meno degne di considerazione le altre azioni della vinilamina. Non che anche dagli altri citati autori non fosse stato ricordato che la vinilamina può dar luogo a gravissimi fenomeni a carico del sistema nervoso centrale, allorquando si sorpassino dosi di gr. 0,012—0,02 pro Kilo, ma la preoccupazione degli autori che ci precedettero in queste ricerche fu appunto unicamente quella di avvicinarsi a queste dosi senza sorpassarle, allo scopo di lasciare svolgere nello spazio di tempo di 3—4 giorni, la tipica lesione della papilla renale e senza curarsi di osservare se, contemporaneamente, anche il sistema nervoso centrale presentasse almeno microscopicamente delle lesioni. Eppure i fatti di paresi spastica che compaiono, specie nei cani per l'azione di dosi non troppo

elevate o di paralisi addirittura completa del treno posteriore e anche dell'anteriore per dosi maggiori, i tremori, il nistagmo, facile a verificarsi specie nei conigli, la comparsa talvolta di anisocoria nei cani, i disturbi della deglutizione che in qualche caso possono portare allo svolgimento di una polmonite ab ingestis, il fatto che anche per dosi relativamente notevoli si svolge un quadro tossico che di solito non dura meno di 4 giorni, tutti questi fatti fondarono in noi il convincimento che si organizzassero realmente delle profonde lesioni del tessuto nervoso.

Abbiamo detto dosi piccole, dosi relativamente notevoli ; si tratta in ogni caso di dosi tali che stanno a dimostrare quale potente veleno sia la vinilamina, e quanto differente sia il suo meccanismo di azione da altri veleni anche potentissimi. Varranno a dimostrazione del nostro quello di asserto le storie che riporteremo con qualche particolare per dare un'idea al lettore, del quadro tossico della vinilamina.

Allo scopo di studiare sistematicamente l'azione della vinilamina sul sistema nervoso, noi abbiamo creduto opportuno di eseguire esperienze somministrandola per diverse vie di assorbimento ed abbiamo perciò usate le vie ipodermica, la endovenosa, la peritoneale e l'endorachidiana.

Lo scopo delle ricerche eseguite iniettando il veleno per via endorachidiana era triplice. 1° Vedere se, allorquando la sostanza veniva portata su tessuto nervoso in uno stato di concentrazione certo assai piccolo, ma sempre grandemente maggiore in confronto a quando, assorbita per altre vie, venga prima diluita nella massa sanguigna, si manifestassero delle spiccate lesioni nervose ; 2° Indagare se l'affinità tra vinilamina e il sistema nervoso, su cui tanto venne richiamata l'attenzione da R. Luzzatto, fosse tale da far si, che dosi piccole ma pur sempre tali da dar luogo alla nefrite papillare iniettate per altre vie, potessero per via endorachidiana essere cosi solidamente fissate dal sistema nervoso, da venir sottratte alla circolazione senza dar luogo quindi alla detta forma di nefrite ; 3° Vedere se dosi piccole e tali da non portare nell'animale se non lievi e transitori disturbi nella funzione renale se iniettate per via ipodermica o endovenosa, davano luogo invece a un quadro grave se somministrate per via endorachidiana.

Diciamo subito che i risultati delle esperienza riuscirono di piena conferma alle nostre ipotesi. Abbiamo prima detto che per iniezione endorachidiana la vinilamina arrivava in contatto col midollo spinale in concentrazione maggiore di quello che si verifica se iniettata per altre vie. Riteniamo necessario togliere subito al lettore il dubbio che potrebbe insorgere, che si avesse in questi casi a che fare con una azione caustica banale, quasi come se venisse iniettato nel rachide un acido o una base concentrata. Ma la vinilamina non ha alcuna azione caustica ed ogni dubbio anche il più lontano cadrebbe solo che noi ricordiamo

la concentrazione delle soluzioni usate. Infatti (*) la vinilamina che non si trova in commercio, perchè alterabilissima, venne da noi semper preparata per distillazione in presenza di alcali, dal bromidrato di brometilamina purissima, e questo, distillato, contenente a seconda delle varie esperienze da gr. 0,01—0,02 di vinilamina veniva esattamente neutralizzato con una soluzione titolata di HCl, indi allungato ancora con soluzione fisiologica di NaCl, in modo da iniettare nel rachide lentamente da tre a cinque cc. di una soluzione di concentrazione corrispondente circa al 2—4 ‰ di vinilamina, allo stato di cloridrato assolutamente neutro. *Anche quando la sostanza viene iniettata in dose di gr.* 0,01—0,02 *complessivamente nella cavità rachidiana anche di un grosso cane, passa sempre un certo periodo di tempo prima che si svolgano i fenomeni tossici gravi, da 6 a 24 ore*, ma poi il quadro si svolge in tutta la sua imponenza. Ciò dunque dimostra che non basta il semplice contatto della sostanza col tessuto nervoso per il manifestarsi della sua azione tossica, ma che occorre un certo tempo perchè la sostanza si fissi ed esplichi le sue azioni.

***

Prima di esporre i risultati ottenuti nelle nostre esperienze, riteniamo opportuno di descrivere la tecnica adottata per lo studio delle eventuali lesioni del sistema nervoso centrale negli animali avvelenati con vinilamina.

Per potere eseguire le ricerche coi principali metodi per l'esame istopatologico del sistema nervoso, abbiamo in ogni esperienza fissato subito dopo la morte, parti dell'asse cerebro-spinale in liquido di MÜLLER, in formalina soluz. 15 % della soluz. commerciale, in alcool a 95° e in piridina.

Non ci fermiamo a descrivere la tecnica relativa ai metodi di NISSL per la sostanza cromatica, di WEIGERT-PAL, di MARCHI-VASSALE perchè sono di antica data. Riteniamo opportuno invece di descrivere dettagliatamente i metodi del DONAGGIO (**) per lo studio delle cellule e delle fibre nervose lese.

***

L'applicazione dei metodi DONAGGIO per le fibre nervose, era addirittura indispensabile nel nostro caso per uno studio delle eventu-

---

(*) Per i particolari relativi alla preparazione della vinilamina cf. il lavoro citato di R. LUZZATTO.

(**) Esprimiamo i sensi del nostro animo profondamente grato al Chiar. mo Prof. ARTURO DONAGGIO, Direttore della Clinica delle malattie nervose e mentali, il quale non soltanto ci diede dei preziosissimi suggerimenti relativi alla tecnica istologica del sistema nervoso, ma ancora si prestò ad esaminare i nostri preparati confortando con il suo autorevole giudizio l'importanza dei reperti istologici da noi constatati

ali lesioni e diciamo indispensabile giacchè, sopravvivendo gli animali appena 3—4 giorni, era assai poco probabile che avessero potuto stabilirsi in un così breve periodo di tempo delle lesioni secondarie rivelabili col metodo MARCHI o MARCHI-VASSALE, e così pure che la degenerazione potesse essere così avanzata da risultare nettamente rilevabile col metodo di WEIGERT-PAL il quale come è noto dà i risultati più netti allorquando il tessuto è sclerosato. Nel caso poi più probabile, che al momento della morte fossero presenti almeno prevalentemente lesioni primarie, allora queste, non rivelabili assolutamente col metodo MARCHI-VASSALE, sarebbero state messe bene in evidenza dal metodo DONAGGIO almeno nella loro I^a e II^a fase e dato che gli animali non erano sopravvissuti oltre i 4—5 giorni, non avrebbe potuto ancora avere luogo l'ultima fase di sclerosi durante la quale naturalmente il metodo DONAGGIO riesce negativo mentre riesce allora nettamente positivo il metodo di WEIGERT-PAL. Questo metodo riesce debolmente positivo nella II^a fase della degenerazione primaria. Prima che il DONAGGIO proponesse i suoi metodi mancava « una colorazione positiva delle fibre nervose nella fase iniziale della degenerazione primaria ; intesa come colorazione positiva, un procedimento che metta in evidenza le fibre lese e lasci scolorate le fibre normali ».

Diremo quindi della tecnica riguardante i metodi DONAGGIO (6) per mettere in evidenza la degenerazione delle fibre nervose nella fase iniziale : Pezzi di tessuto nervoso fissati per un periodo di qualche mese in liquido di MÜLLER, o in bicromato di Potassio al 4 %, vengono passati direttamente in alcool, indi inclusi in celloidina e sezionati. A questo punto le modalità tecniche da seguire possono essere due : I^a *Modalità*. Le sezioni, che devono presentare uno spessore da 20 a 30μ, lavate in acqua distillata per alcuni secondi, si pongono nell'ematossilina al cloruro di stagno ammoniacale per 20'-30' (*). Si passano poi rapidamente in acqua distillata e si sottopongono alla decolorazione applicando il metodo Pal, ossia immersione delle sezioni in una soluzione al 0,25 % di permanganato di potassio, rapido lavaggio in acqua distillata, immersione in una miscela di soluzione di solfito di sodio 1 % e acido ossalico 1 % in parti eguali per 3-4 minuti e questi passaggi ripetuti fino a quando si abbia la decolorazione delle fibre normali, mentre restano colorate solo le fibre lese : ciò che si può osservare sorvegliando la decolorazione al microscopio. Decolorate le sezioni, si lavano nuovamente in acqua distillata per 3-5 minuti si passano per la serie degli alcool, si rischiarano in Xilolo e si chiude il preparato nella miscela del DONAGGIO costituita da gr. 12 di resina Dammar sciolta in cc. 10 di Xilolo e cc. 10 di etere di petrolio.

Il procedimento ora descritto vale sopratutto per le fibre tagliate trasversalmente. Le fibre anche normali in sezione longitudinale oppongono una resistenza alla decolorazione poco dissimile da quelle lese.

In tal caso vanno considerate lese solo quelle fibre che si presentano sotto forma di goccie seriali assolutamente separate le une dalle altre.

II^a *Modalità*. Le sezioni vengono colorate in una soluzione acquosa di ematossilina al 0,5-1 % per 10'-20', si passano poi nella soluzione acquosa satura di acetato

---

(*) La soluzione di ematossilina stannica si prepara unendo in parti uguali una soluzione acquosa 20 % di cloruro di stagno ammoniacale con una soluzione acquosa di ematossilina all' 1 %.

di rame dove si lasciano per circa 30' rinnovando però detta soluzione almeno una volta. Le sezioni si decolorano col metodo Pal sopra citato, si lavano rapidamente in acqua distillata, si passano nella serie degli alcool e si montano nella miscela DONAGGIO.

Con la 1ª modalità si ha una tonalità rosso viola e nelle fibre trasversali lese si scorgono particolarità di struttura delle fibre modificate.

Il secondo procedimento, all'ematossilina ramica porta a una meno difficile differenziazione delle fibre lese sezionate longitudinalmente, che appaiono disposte, come si é detto, in goccie a serie colorate in nero, nero bleu, grigio ecc.

Per la colorazione del reticolo neurofibrillare endocellulare ci siamo serviti dei metodi 3° e 4° del DONAGGIO (7):

Metodo III°. — (Serve per il midollo spinale, per il bulbo, la protuberanza, i gangli spinali e i gangli del simpatico).

1) Fissazione e indurimento dei pezzi dello spessore di circa 5 mm in piridina per 7 giorni. La piridina che specie nei primi giorni di fissazione deve trovarsi in quantita notevole in rapporto ai pezzi fissati, deve essere cambiata dopo 5-6 ore, poi di nuovo dopo 2 giorni.

2) Passaggio nell'acqua distillata per 24 ore rinnovandola spesso; dopo qualche ora si tagliano i pezzi in modo che abbiano lo spessore di 2-3 mm. Trascorse le 24 ore, i pezzi vengono passati in un nuovo recipiente con acqua distillata in modo che non contengano più alcuna traccia di piridina.

3) Passaggio dei pezzi per 24 ore in una soluzione acquosa 3-4 % di molibdato d'ammonio (per ogni grammo di molibdato si aggiunge una goccia di acido cloridrico puro). La soluzione di molibdato deve essere preparata di recente.

4) Dopo un lavaggio nell'acqua cambiata una o due volte per 2-4 minuti si fanno i passaggi abituali per l'inclusione in paraffina. E' utile di non sorpassare nell'inclusione in paraffina la temperatura di 52°.

Colorazione. Le sezioni dallo spessore di 3-7μ. vengono attaccate al vetrino coprioggetto con acqua distillata e si lasciano essicare a 37° o alla temperatura ambiente indifferentemente. Indi si passano in Xilolo per due volte, poi in alcool assoluto per due volte, nell'alcool comune e in fine nell'acqua in modo che la superficie del vetrino che porta le sezioni sia rivolta in basso. L'immersione delle sezioni nell'acqua deve essere rapidissima, da mezzo a un minuto. Dall'acqua si fan passare le sezioni in una soluzione acquosa di tionina al 1 per 30000 e vi si lasciano, sorvegliando la differenziazione, fino a che osservando al microscopio non si scorgono nettamente colorate in viola rossastro le fibrille, e il nucleo completamente decolorato. E' necessario, immerse le sezioni nella sostanza colorante, di agitare per impedire la formazione di precipitati. A questo punto si possono seguire due procedimenti:

a) Le sezioni si immergono nell'acqua distillata per qualche secondo, poi nell'alcool comune dove le sezioni perdono in parte il colore producendosi così una differenziazione più netta; l'immersione in alcool comune si continua fino a che le sezioni non cedono più colore. Si passano poi in nuovo alcool comune, si disidratano in alcool assoluto, si rischiarano in xilolo e si montano dopo averle asciugate con carta bibula, nella miscela DONAGGIO.

b) Passate le sezioni dalla sostanza colorante nell'acqua distillata e da questa nell'alcool comune, si ripassano di nuovo nell'acqua distillata per un tempo strettamente necessario perché le sezioni cedano l'alcool. L'acqua distillata quindi deve essere cambiata 2 o 3 volte affinchè non vi siano più traccie di alcool. Dall'acqua si passano le sezioni nella soluzione di molibdato di ammonio ottenuta nel modo già detto, per 15-30 minuti, si lavano poi nell'acqua distillata per 13-20 minuti rinnovandola 3 o 4 volte. Passaggio in alcool comune, in alcool assoluto, in xilolo e chiusura del preparato con la miscela DONAGGIO. Col procedimento *b*) i filamenti del reticolo si vedono con maggiore chiarezza.

Metodo IV°. — (Serve per il cervello e il cervelletto). La fissazione si eseguisce con una miscela così composta: a 72 parti di piridina si aggiungono 28 parti di una soluzione acquose al 50 % di acido nitrico.

Prima di usare il liquido bisogna aspettare che diventi freddo.

I pezzi dello stesso spessore che nel metodo III°, restano nella miscela sopra descritta per 24 ore (cambiandola una volta dopo 5-6 ore), poi si passano in piridina pura per 48 ore, si lavano in acqua distillata, dopo di che si seguono esattamente le regole indicate nel metodo III°.

* * *

Noi possiamo dividere le esperienze da noi eseguite in due gruppi fondamentali: 1° quello nel quale l'assorbimento della vinilamina ha luogo attraverso la via ipodermica, endovenosa o peritoneale; 2° quello (via endorachidiana) nel quale il veleno giunge direttamente a contatto col tessuto nervoso.

1° *Gruppo* = A titolo di esempio citiamo alcune fra le molte esperienze eseguite in proposito.

Esperienza N. 3. Cane Bob-Peso Kg. 15. — 28-V-1918, ore 16,25 iniezione endoperitoneale di gr. 0,05 di cloridrato di vinilamina. Ore 18,30 il cane sta bene. Il 29 l'animale presenta vomito, rifiuta il cibo, e si nota un accenno a tremori. Il 30 l'animale sta coricato, si constata rigidità spastica e se si tenta di mettere in piedi l'animale, barcolla; presenta pure trisma. Esaminata l'orina che emette in quantità notevole, questa presenta un peso specifico di 1005 e traccie di albumina. Il 31 nelle ore antimeridiane l'animale peggiora sempre, i tremori sembrano più accentuati a sinistra, si palpano sotto le dita scosse cloniche di tutti i muscoli. Messo in piedi l'animale vi resta con la testa ciondoloni, senza potere fare un passo, nè senza poter coricarsi per la rigidità degli arti. Si esamina l'orina che presenta gli stessi caratteri della precedente. Il 31 nelle ore pomeridiane si nota anisocoria, con midriasi a sinistra; non nistagmo, l'animale presenta i fenomeni sopra descritti più accentuati. L'intelligenza sembra conservata, l'animale cerca di bere e la deglutizione dell'acqua appare lievemente ostacolata. Più tardi si inizia uno stato comatoso durante il quale non cessano le scosse muscolari. Il 1° giugno alle 13,30 muore.

All'autopsia si nota un piccolo infarto nel polmone destro, necrosi della parete intestinale nel punto in cui avvenne l'iniezione, necrosi della papilla renale. Nulla di notevole a carico degli altri organi. Estratto l'asse cerebro-spinale, macroscopicamente non si osservano fatti degni di nota.

Reperto microscopico. — In questo cane l'asse cerebro spinale non presenta macroscopicamente come abbiamo detto alcuna lesione non solo all'autopsia ma neppure a fissazione avvenuta in liquido di Müller. Con l'esame microscopico eseguito col metodo Donaggio per la degeneraz. delle fibre, non siamo riusciti a constatare lesioni nel cervello, nel cervelletto e nel bulbo. Appaiono invece evidenti delle lesioni in alcuni tratti di midollo cervicale e di midollo dorsale superiore. Le fibre degenerate si trovano di preferenza alla periferia del midollo in numero cospicuo e circondano per così dire anteriormente e lateralmente il midollo stesso. Fibre degenerate però sono sparse anche qua e là verso la parte interna del midollo approfondendosi nella sostanza bianca per circa 1/3 della sua superficie e in corrispondenza dei cordoni anteriori e laterali; (Vedi fig. N. 3), altre

ancora si trovano nella sost. bianca subito dietro la commessura grigia, per cui possiamo parlare della presenza di lesioni a tipo disseminato.

Tolte le fibre degenerate che per la loro condizione patologica speciale hanno acquistato la proprietà di trattenere la lacca ematossilinostannica, per cui appaiono come goccie di varia grandezza colorate in rosso-violetto, la struttura del rimanente tessuto nervoso quasi da per tutto è ben conservata. Se noi osserviamo, preparati istologici eseguiti col metodo WEIGERT-PAL, si nota oltre alla presenza di fibre intensamente colorate in nero-bleu alla periferia, delle zone scolorate corrispondenti a tratti nei quali esiste una rarefazione delle fibre nervose (vedi fig. 6).

Col metodo MARCHI abbiamo ottenuto *sempre reperti negativi*.

Nè gli elementi cellulari nervosi vengono risparmiati dalla vinilamina. Col metodo DONAGGIO alla piridina, si dimostra nelle cellule nervose una tendenza alla conglutinazione dell'apparato neurofibrillare, conglutinazione però che si nota solo in alcuni elementi mentre altri conservano inalterata la loro struttura.

Ricordiamo da ultimo di avere osservato in modo evidentissimo nei preparati allestiti col metodo NISSL, la totale lisi della sostanza cromatica.

Esperienza N. 17. — Cane Nettuno-Peso Kg. 6. — 13-7-1920, ore II, 55 iniezione endovenosa nella tibiale posteriore di gr. 0, 0288 di cloridrato di vinilamina. Dopo due ore il cane vomita ed è piuttosto abbattuto. Ore 18,30 si nota uno stato di paresi spastica al treno posteriore tanto che il cane stenta a coricarsi. Presenta una nettissima contrazione spastica al labbro superiore. Il 14 alle ore 10 si esamina l'orina il cui peso specifico è di 1011 e contiene albumina in quantità notevole. Il 15 il cane è molto svogliato, ha diarrea e vomito, tremore e spasmo negli arti posteriori. Questi fatti aumentano d'intensità specie quelli a carico del sistema nervoso. Il 17 il cane non riesce quasi più a camminare, barcolla e cade per uno stato di paralisi al treno posteriore. L'intelligenza però è conservata. Il 18 il cane muore.

All'autopsia si notano nei reni fatti di congestione spiccata nella sostanza midollare. Gli altri organi sono tutti apparentemente normali e così il sistema nervoso centrale, che per le varie ricerche microscopiche, viene sottoposto a fissazione.

REPERTO MICROSCOPICO. — Col metodo DONAGGIO nel bulbo nel midollo cervicale e dorsale si riscontrano sparse qua e là delle fibre degenerate, ma in minore numero però che nella esperienza precedentemente citata.

Inoltre dette fibre degenerate non sono raggruppate a focolaio in alcun punto delle sezioni, ma in mezzo al tessuto normale spiccano delle goccie isolate colorate in nero grigio ecc. o rosse a seconda che si sia usata la I^a o II^a modalità del metodo DONAGGIO per le degenerazioni. Nessuna lesione viene messa in evidenza col metodo WEIGERT-PAL. E negative pure riuscirono le indagini relative allo studio delle cellule nervose.

Esperienza N. 22. — Cane Dick-Peso Kg. 7,200. — 4-12-1920, ore 16 si iniettano in una vena superficiale di una zampa posteriore gr. 0,0002 di cloridrato di vinilamina. L'animale sembra non risentirsi punto dell'iniezione e l'orina eliminata nei giorni 5 e 6 è normale e di peso specifico 1025. Il 6 alle ore 16,50 iniezione di gr. 0,00032 di clorid. di vinilamina Il 7 ore 16 iniezione di gr. 0,0004 di clorid. di vinil. L'8 l'orina contiene traccie di albumina; il peso specifico però è 1050. Ore 16 iniezione di gr. 0,0004 di clorid. di vinil. Il 10 iniezione di gr. 0,0004 di clorid. di vinil. Si osserva nel pomeriggio lievissimo accenno a paresi-spastica nel treno posteriore. L' II iniezione di gr. 0,00064 di clorid. di vinil. Il 14 mantenendosi immutate le condizioni dell'animale si iniettano per via ipodermica gr. 0,0012 di clorid. di vinil. Il 15 l'orina presenta sempre gli stessi caratteri. Si osserva uno stato di spasmo più spiccato in corrispondenza degli arti posteriori. Non si può parlare di fatti di paresi, giacchè l'animale si muove facilmente ed arriva anche a compiere dei salti; ma allorchè dopo essersi rizzato sulle zampe posteriori e dopo aver corso un po', l'animale tende a riprendere la sua posizione normale, si osserva allora che ora l'uno ora l'altro degli arti posteriori presenta uno stato di modica flessione spastica per cui l'animale sta in equilibrio con tre zampe. E' visibilissimo lo sforzo, relativamente ben lungo il periodo di tempo che si esige perchè l'animale arrivi a distendere l'una o l'altra delle zampe contratte. Nello stesso tempo, nel rimettersi nella posizione normale, l'animale presenta disturbi di equilibrio caratterizzati da accenni di barcollamento, disturbi che l'animale tende a correggere tenendo gli arti posteriori molto più allargati di quanto si osserva di norma. Quando l'animale mangia, si nota un aumento notevole di rigidità del treno posteriore che viene alquanto sollevato mentre vi sono evidenti tremori. Il 16 l'animale presenta *meno spiccati* i fenomeni sopra descritti. Il 18 si pratica una iniezione ipodermica di gr. 0,001 di clorid. di vinil. Il 20 l'orina presenta i soliti caratteri, si riaccentuano però i fatti di paresi al treno posteriore. Il 20 e 21 iniezione sotto cutanea di gr. 0,002 di clorid. di vinil. Il 23 la paresi spastica del treno posteriore è più spiccata e l'animale non è più capace di saltare da solo giù dalla propria gabbia. Il 24 iniezione di gr. 0,002 e il 27 di gr. 0,004 di clorid, di vinil. Il 28 permanendo uguali i fenomeni sopra descritti si pratica una iniezione di gr. 0,005 e così il giorno 30. L'intelligenza è sveglia. Il 31 l'animale presenta un notevole peggioramento, spiccati tremori e rigidità del treno posteriore, cammina barcollando e tiene la testa ciondoloni. Il 1° Gennaio 1921 si accentuano notevolmente i fenomeni già descritti. L'orina poi, contiene traccie evidenti di albumina. Il 2 gennaio il cane muore: il suo peso è di Kg. 5,500.

All'autopsia non si osservano macroscopicamente fatti degni di nota.

All'esame microscopico non abbiamo riscontrato fino ad ora alcuna lesione. Abbiamo in corso esperienze nelle quali è nostra intenzione di usare dosi con le quali si possa sperare di tenere gli animali in vita anche per mesi. Se in questi casi avremo risultati degni di nota non mancheremo di comunicarli.

*
* *

II° Gruppo di Esperienze.

Prendiamo ora a considerare i casi in cui il veleno sia stato iniettato direttamente nello speco vertebrale.

Per amore di brevità riportiamo due fra le molte esperienze eseguite tutte concordi fra loro.

Esperienza N. 11. — Cane Saturno-Peso Kg. 11. — 29 Maggio 1919, iniezione endorachidiana di gr. 0,01 di cloridrato di vinilamina. Subito dopo l'iniezione il cane sta perfettamente bene. Dopo 4 ore circa ha vomito e si nota una lieve diminuzione di forze nel treno posteriore, tremori muscolari specie durante gli sforzi del camminare.

Dopo alcune ore l'animale fa qualche passo, ma preferisce posarsi sul treno posteriore, ciò che pure riesce difficile per un certo grado di rigidità spastica negli arti posteriori. L'animale si regge tenendo gli arti posteriori fortemente allargati, la testa è ciondoloni. Circa 24 ore dopo l'animale presenta paralisi spastica del treno posteriore, perdita di feci e orine che non presentano albumina, tremori e scosse muscolari, tendenza a spasmo pure degli arti anteriori e così giace bocconi per terra, senza che le funzioni psichiche appaiano alterate, tanto che l'animale senza riuscirvi cerca di avvicinarsi al recipiente ove si trova l'acqua che di solito in queste condizioni è sempre desiderata.

Tali condizioni permangono fino al giorno 31. L'animale perde orina che però non contiene albumina, presenta soltanto qualche movimento di lateralità del capo, e alle ore 10 del 1° giugno muore.

All'autopsia contrariamente a quanto abbiamo visto accadere nei casi precedentemente descritti, noi qui potemmo constatare già macroscopicamente, come il midollo spinale nella regione lombare inferiore fosse gravemente alterato. Grande fu la difficoltà per estrarlo dalla cavità rachidiana poichè esso, presentando qua e là uno stato di rammollimento, con grande facilità avrebbe potuto spappolarsi.

A fissazione avvenuta, potemmo vedere ancor meglio quanto gravi fossero le alterazioni specie nel midollo lombare. Chiazze biancastre di forma irregolare si trovano in corrispondenza dei cordoni anteriori e antero-laterali, chiazze che sono talmente estese da invadere in parte anche le corna anteriori (fig. N. 1). Tali alterazioni si notano pure sebbene meno estese nei fasci di GOLL e di BURDACH. La distribuzione irregolare di dette chiazze, il loro colore biancastro che spicca nettamente sul resto del tessuto non leso di dette sezioni, macroscopicamente ricorda assai il quadro anatomo-patologico della sclerosi a placche. Le sezioni nei preparati eseguiti col metodo DONAGGIO per le fibre, dimostrano chiaramente la imponenza dei fatti degenerativi. Goccie di varia grandezza nere, grigie, viola ecc. invadono il campo microscopico (fig. N. 4). Qua e là fra spazi chiari in cui, il tessuto evidentemente è andato distrutto, si vedono più gocce riunite insieme ; però anche qui non possiamo parlare di fasci completamente lesi, ma di lesioni disseminate, per cui accanto a focolai di profonda degenerazione, si osservano zone bene conservate. Man mano che si procede verso il midollo dorsale, le lèsioni diminuiscono di intensità per scomparire completamente all'altezza del midollo cervicale.

Col metodo WEIGERT-PAL si notano scolorati i tratti ove esistono zone di rarefazione. Il Marchi anche qui ci ha dato risultati completamente negativi

Le cellule nervose risentono anch'esse grandemente in questo caso l'azione della vinilamina e a seconda del tratto esaminato si osserva che o sono quasi completamente distrutte, o le lesioni prodotte in essa constano nella scomparsa del reticolo endo-cellulare per conglutinazione cospicua (fig. N. 7). Procedendo verso il midollo dorsale si osserva che altre cellule invece hanno risentito in minor grado l'effetto della vinilamina, presentando un tipo di modificazione iniziale con un ispessimento periferico del reticolo endo-cellulare che però, in questi casi, è conservato nella quasi totalità (Fig. N. 8).

Esperienza N. 10. — Cane Marte-Peso Kg. 16. — 9 Maggio 1919, ore 18, iniezione endorachidiana di 2 ctgr. di cloridrato di vinilamina. Il giorno dopo l'animale si trova quasi completamente paralizzato in preda a violente scosse muscolari. L'intelligenza però è sempre conservata. L'orina si presenta quasi normale e non si notano che traccie di albumina. Le condizioni sovraesposte vanno sempre più aggravandosi e l'animale muore il 14 Maggio in preda a fenomeni analoghi a quelli già descritti nella precedente esperienza.

All'autopsia non si riscontra nulla di anormale eccetto che nel rene dove si notano delle lesioni alla papilla

Pezzi di midollo fissati in liquido di Müller presentano nella regione lombare e dorsale inferiore chiazze biancastre disseminate qua e là a focolaio, mentre macroscopicamente il resto del tessuto sembra normale (fig. N. 2).

Reperto microscopico. - Le lesioni che si riscontrano all'esame istologico in corrispondenza delle chiazze biancastre sono le stesse che abbiamo già descritto a proposito dell'esperienza precedente. Anche qui accanto a zone profondamente lese, troviamo numerosi tratti di tessuto ben conservato, in mezzo a cui però si trovano qua e là isolate alcune fibre lese. Nella figura N. 5 abbiamo riprodotto una sezione longitudinale di midollo lombare colorata col metodo Donaggio all'ematossilina-ramica corrispondente ad un punto leso. Le grosse gocce nere e viola disposte in serie, dimostrano la imponenza delle lesioni nelle fibre; qua e là si scorgono alcuni cilindrassi abbastanza ben conservati, altri invece presentano varicosità più o meno accentuate.

Crediamo assai degno di considerazione, ricordare che sia nella prima serie di esperienze, che nella seconda, non fu possibile mettere in evidenza lesioni vascolari o fatti infiammatori.

***

Se noi consideriamo i reperti ottenuti con i vari metodi messi in pratica per lo studio delle lesioni del sistema nervoso negli animali avvelenati per via endovenosa, endoperitoneale e ipodermica da una parte, e endorachidiana dall'altra, dobbiamo riconoscere che, a parte l'intensità delle lesioni, il tipo di queste è identico nelle due serie di esperienze. E precisamente noi dobbiamo ritenere che si tratti di lesioni disseminate quasi esclusivamente nell'asse spinale, con localizzazione prevalentemente alta negli animali avvelenati per via endovenosa, endoperitoneale e ipodermica, e prevalentemente bassa, come d'altra parte è naturale, negli animali nei quali il veleno venne introdotto per via endorachidiana. Di fronte a quale tipo di lesioni siamo noi davanti? I risultati ottenuti coi metodi applicati stanno nettamente a dimostrare che, almeno per la massima parte, si tratta di degenerazioni primarie nella loro fase iniziale o in certi casi in fase un po' più avanzata, ma non già in fase avanzatissima o tardiva, che evidentemente non avrebbe avuto tempo di svolgersi nel breve periodo di 4—5 giorni. Abbiamo detto degenerazioni prevalentemente primarie.

Non possiamo però escludere che non si sia presenti anche a degenerazioni secondarie nella loro I^a fase durante la quale, il metodo Marchi riesce completamente negativo. Gli importantissimi studi del Vassale (8) sulle differenze anatomo-patologiche fra degenerazioni primarie e secondarie dei centri nervosi, hanno dimostrato che le fibre nervose in degenerazione primaria vanno incontro a un processo di atrofia lenta; il cilindrasse non viene distrutto almeno per lunghissimo tempo, ciò che spiega la guaribilità della lesione, quando l'azione del tossico venga a cessare e il processo degenerativo non sia passato dalla fase iniziale alla fase dell'iperplasia del tessuto interstiziale che

occupa il posto lasciato libero dalla fibra profondamente atrofizzata. Quindi nelle degenerazioni primarie è sopratutto la guaina mielinica che viene inizialmente colpita. Le degenerazioni secondarie invece o (degenerazioni WALLERIANE) sono come é ben noto, in rapporto con una scontinuità della fibra, per cui nel tratto distale mancando l'influenza trofica dal neurone corrispettivo, ha luogo una degenerazione. Perchè si produca questa degenerazione occorre un certo numero di giorni e perciò, il preziosissimo metodo di MARCHI-ALGERI non riesce altro che entro il periodo di tempo in cui la lesione si è già ben stabilita, mentre in un periodo di tempo successivo, quando cioè subentra la fase dell'ipertrofia del tessuto interstiziale con scomparsa del tessuto nervoso, detto metodo riesce completamente negativo, mentre, come già abbiamo accennato, é allora che viene applicato col maggiore vantaggio dimostrativo il metodo di WEIGERT-PAL.

Ora VASSALE ha fatto osservare, che oltre a cause meccaniche che interrompono le fibre nel loro tragitto o ledono le loro cellule di origine, anche fatti tossici possono condurre a degenerazioni secondarie, allorquando il tossico sia cosi violento da produrre discontinuità in alcune fibre. E perciò non é possibile, allorquando si è dinanzi come in alcuni dei nostri casi, a lesioni primarie di intensità imponente, escludere che in seno al focolaio di degenerazione primaria, si vadano stabilendo anche delle degenerazioni secondarie. Noi possiamo solo, in base alla intensa reazione osmica che caratterizza il metodo di MARCHI, ammettere che nelle degenerazioni secondarie abbia luogo formazione o liberazione di acidi grassi non saturi capaci appunto di ridurre l'acido osmico. E dobbiamo perciò anche ammettere che nelle degenerazioni primarie, detti acidi grassi non saturi, non siano presenti o liberi, mentre per ragioni chimiche o fisico-chimiche che ancora ci sfuggono, le modificazioni che stanno a base delle degenerazioni primarie hanno la proprietà, dimostrata dal DONAGGIO, di fissare tenacemente la lacca ematossilina-stannica e ematossilinoramica, per la quale, dette fibre degenerate sono messe in evidenza coi metodi di detto autore. Degenerazioni primarie per opera di tossici energici furono dimostrate da parte di parecchi autori, lesioni prevalentemente sistematiche, ma in parte anche più o meno diffuse nel midollo spinale (cf. DONAGGIO, nota 6).

Ma nei nostri casi, ripetiamo, *ciò che è tipico è la disseminazione della lesione*. La vinilamina è, si può ben dirlo, un tossico sui generis, che presenta come più volte fu accennato la massima affinità per il sistema nervoso, tanto da venire tenacemente fissata da questo risparmiando molti altri tessuti. Così ad es. noi abbiamo invano cercato nei numerosissimi nostri preparati di sistema nervoso, lesioni vasali infiammatorie con le quali potessero essere messe in rapporto le alterazioni del tessuto nervoso. Non abbiamo riscontrato quindi infiltrazioni parvicellulari, presenza di manicotti perivascolari, ispes-

simenti dell'intima o delle altre tonache vasali, fatti trombotici od embolici (*).

Fatalmente la vinilamina è un veleno così potente che male si presta ad esperienze prolungate per molto tempo.

L'affinità che essa oltre che per il sistema nervoso presenta per il rene (papilla), contribuisce pure ad abbreviare la vita degli animali e a non lasciare perciò il tempo perchè si sviluppino quelle altre lesioni tardive (sviluppo del tessuto interstiziale) che avrebbero completato per così dire il quadro anatomo-patologico, dando una idea più precisa della sua evoluzione. Ma giustamente il lettore potrebbe obbiettare che si potevano usare dosi assai più piccole. Se non che, come risulta da esperienze già pubblicate da R. LUZZATTO (I) la vinilamina per determinare delle lesioni deve raggiungere una certa concentrazione. sia pur questa piccolissima, nel sangue. Ove si stia al disotto di una certa dose, l'animale, cane o coniglio, non presenta assolutamente fatti degni di nota anche se la dose sia ripetuta per molti e molti giorni di seguito; l'orina si presenta normale, insomma nessun fatto patologico si manifesta. Evidentemente gli animali hanno una capacità per quanto limitata, di distruggere piccolissime dosi di questa sostanza. Ma ove le dosi, per così dire subminimali, vengano appena di poco aumentate, immediatamente compaiono fatti gravi che in pochi giorni conducono a morte l'animale.

Per quale ragione poi alcuni tratti del sistema nervoso vengano colpiti dall'azione della vinilamina e altri ne restino esenti, pur arrivando questa sostanza col sangue a tutto il sistema nervoso, è cosa che sfugge per il momento alle nostre indagini ; mentre è pur ben comprensibile perchè, quando la vinilamina è iniettata per via endorachidiana, determini le massime lesioni nella porzione bassa del midollo, ossia in corrispondenza di quei tratti coi quali arriva direttamente in contatto *e dai quali viene poi così tenacemente fissata che se la dose non è molto notevole, la vinilamina viene sottratta all'assorbimento* ; *ed in questi casi, mentre le lesioni del midollo sono imponenti, sono nulle o lievissime le lesioni renali come nel modo più chiaro è dimostrato dalle riportate esper* N. 10-11. Un'altra prova dell'affinità grandissima che presenta il tessuto nervoso verso la vinilamina è data dal fatto che dosi di gr. 0,0005 = 0,001 pro Kilo iniettate nei cani per via endovenosa o ipodermica non determinano alcun fatto degno di nota o tutto al più una transitoria albuminuria. Se la stessa dose invece viene in contatto diretto col midollo spinale (iniezione endorachidiana) si ha un quadro nervoso e lesioni anatomo-patolo-

(*) Neppure sugli elementi morfologici del sangue la vinilamina esplica almeno per le dosi usate, nessuna azione. Infatti in alcune esperienze in cui abbiamo iniettato il veleno per via endovenosa, il numero dei globuli rossi e bianchi, l'emoglobina e la formula leucocitaria non si modificarono nè subito dopo, nè molte ore dopo l'iniezione.

giche imponenti. Evidentemente quando per via endovenosa vengono iniettate le dosi ora indicate di vinilamina, una gran parte di essa deve essere stata distrutta in circolo o in altri tessuti o eliminata, per cui soltanto una minima frazione della sostanza introdotta sarà arrivata al sistema nervoso centrale.

***

Se noi volessimo, magari lontanamente, paragonare il quadro tossicologico e anatomo-patologico che caratterizza un avvelenamento subacuto da vinilamina, con quadri clinici e anatomo-patologici che insorgono spontaneamente nell'uomo, o con quadri tossicologici sperimentali, non troveremmo certo corrispondenze esatte, ma semplicemente dei fatti di analogia: così ad es. nell'avvelenamento per ossido di carbonio noi troviamo focolai multipli di rammollimento nel sistema nervoso centrale e specialmente nel cervello, focolai i quali sembrano essere in dipendenza sopratutto di lesioni vascolari acutissime. Nei nostri casi oltre alla mancanza di lesioni vascolari, non si può parlare di veri focolai di rammollimento se non in qualche caso in cui il tossico abbia agito direttamente per iniezione endorachidiana. Focolai di mielite disseminata senza che sia sempre possibile dimostrare lesioni vascolari, si osservano talora spontaneamente nell'uomo. Ma come facilmente si comprende é ben raro che dette forme possano venir osservate al loro inizio, mentre di solito vengono studiate allorquando gli eventuali fatti iniziali infiammatori, possono essere già da lungo tempo scomparsi. Ricordiamo tuttavia come si tenda oggi ad ammettere che non sempre le mieliti disseminate, come pure le lesioni disseminate nell'encefalo, debbano essere primitivamente infiammatorie, ma possano essere anche primitivamente degenerative, ed anzi secondo STERN (9) si dovrebbe riservare il nome di encefalosi (e rispettivamente mielosi) per le encefalopatie e rispettivamente mielopatie di natura non infiammatoria, ma primitivamente degenerativa.

Nei casi subacuti di avvelenamento da vinilamina esiste una sintomatologia che, mutatis mutandis, arieggia al quadro della sclerosi a placche: vale a dire la difficoltà di trasmissione degli stimoli, ma non già l'interruzione attraverso le fibre come si osserva in condizioni, nelle quali la guaina mielinica è lesa gravemente, mentre è conservato il cilindrasse; quadro che si rivela con fatti di paresi spastica e con tremori che si accentuano assai durante i movimenti intenzionali (per es. quando l'animale vuol bere, quando vuol coricarsi sul treno posteriore o accovacciarsi per terra) e finalmente in qualche caso con la comparsa di fatti di nistagmo. E' certo che se gli animali avessero potuto mantenersi in vita per un tempo maggiore, le gravi lesioni descritte nelle fibre si sarebbero almeno in parte evolute verso la fase di sviluppo del tessuto interstiziale con produ-

zione di sclerosi. E' noto che l'etiologia e la patogenesi della sclerosi a placche sono ancora circondate da fitte tenebre (OPPENHEIM, 10). Così si è visto sviluppare questa malattia dopo forme infettive, tifo, vaiolo, coléra ecc. Fu ancora osservato che il raffreddamento (assideramento), può avere importanza come causa occasionale. Fu pure tratto in campo l'avvelenamento da zinco, l'avvelenamento per ossido di carbonio; CENI e BESTA (11) riferiscono d'aver riprodotto la malattia sperimentalmente con l'aspergillus affumigatus; secondo alcuni autori ha importanza la sifilide. Ma nel complesso sino a questi ultimi anni, nessuna affermazione aveva avuto una sanzione concorde e generale da parte dei vari autori (12).

In questi ultimi tempi sembra, specialmente in seguito agli studi di MARINESCO (13), di KALBERLAH (14) e di altri autori, che la sclerosi a placche sia una spirochetosi e si sarebbe anche riusciti a riprodurre la malattia, inoculando liquido cerebro-spinale, o sangue di ammalati di sclerosi a placche a conigli, i quali in un periodo di tempo di pochi giorni avrebbero presentato fatti di paralisi o paresi del treno posteriore, fatti di spasmo ecc. e contemporaneamente presenza di spirochete nel sangue.

Lo spirochete agente della sclerosi multipla non avrebbe nulla a che fare con lo spirochete pallida. Noi non abbiamo la più lontana idea del meccanismo col quale, ammessa vera la teoria infettiva, la spirocheta determinerebbe le tipiche lesioni. Si tratta di eso-o endotossine spirochetiche che ledono direttamente il sistema nervoso, o di lesioni indirette nel senso che un iniziale ricambio patologico del sistema nervoso, per opera di agenti lievemente tossici dia luogo alla formazione di sostanze infinitamente più tossiche derivanti dal tessuto nervoso stesso? La domanda come si comprende è suggestiva e non suscettibile per il momento di risposta. Noi abbiamo voluto affrontare per così dire questa questione senza, come è ben naturale, voler trarre neppur lontanamente conclusioni in proposito. Ma è certo che la nostra domanda non appare illogica quando si consideri: 1° la localizzazione disseminata che caratterizza l'avvelenamento da vilinamina; 2° le lesioni prevalentemente mieliniche con conservazione dei cilindrassi che caratterizzano questo avvelenamento; 3° le scarse lesioni cellulari, a meno che non si tratti di dosi molto elevate; 4° la costituzione chimica del tessuto nervoso; 5° l'azione che alcuni microrganismi esplicano su prodotti di catabolismo del sistema nervoso stesso.

E' ben noto che fra le numerosissime sostanze, che entrano nella costituzione del sistema nervoso, una gran parte è rappresentata da fosfatidi, dai quali può derivare in notevole quantità colina. Non sembra che normalmente esista nel sistema nervoso neurina, ma è ben noto invece, che per opera di numerosi microrganismi la colina può disidratarsi, trasformandosi in neurina ed anzi con ciò, si spieghe-

rebbe l'occasionale presenza di neurina negli estratti di tessuto nervoso. La trasformazione della neurina in colina avrebbe luogo per opera soltanto di alcuni microrganismi e solo in alcune determinate condizioni non esattamente stabilite. Non è da escludersi però secondo GUGGENHEIM (15), che detta trasformazione non sia più frequente di quanto si creda, e che essa spesso sfugga all'osservazione soltanto per il fatto che la neurina stessa soggiace poi a scomposizione dando luogo a prodotti intermedi. I rapporti fra colina e neurina sono, come è ben noto, i seguenti :

$$OH.\,CH_2.\,CH_2.\,\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{HN}}.\,(CH_3)_3 \rightarrow CH_2 \quad CH\,\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{N}}\,(CH_3)_3 + H_2O$$

Si vede dunque che la neurina contiene un gruppo vinilico. E' possibile ammettere che la neurina si demetilizzi e che si stacchi il gruppo vinilico e che questo gruppo vinilico azotato, formatosi in punti diversi del sistema nervoso in quantità pur piccolissima, sia causa di lesioni primarie disseminate ? Teoricamente nessun fatto urta contro l'ipotesi sapendosi bene quanto sia diffuso nell'organismo animale il processo di demetilizzazione, ma, ripetiamo, si tratta di semplice ipotesi, la quale tuttavia trova qualche giustificazione nei fatti indiscutibili delle imponenti lesioni disseminate a cui da luogo la vinilamina in dosi piccolissime. Del resto non dobbiamo neppur dimenticare che dall'epoca memorabile in cui si iniziò per opera di SELMI (1872) (16) e in seguito di GUARESCHI (17) di BRIEGER (18), GAUTIER (19), ACKERMANN (20), KUTSCHER (21) e altri, lo studio delle basi organiche di origine animale, basi che con espressione moderna vengono oggi chiamate « amine biogene », esse dal punto di vista fisiologico e in infiniti quadri patologici hanno assunto la massima importanza. Basterebbe soltanto pensare alla adrenalina che si può far derivare da un amino acido (tirosina), all'istamina che si può far derivare dall'istidina, alla guanidina che si può far derivare dalla creatina, alla putrescina, alla cadaverina e ad infinite altre sostanze le cui azioni, oggi sempre meglio studiate, aprono allo scienziato un campo d'indagini fecondissime (*).

Modena, Nov. 1921.

(*) Ci sembra interessante ricordare, per quanto le nostre esperienze siano appena iniziate e non corredate ancora da ricerche microscopiche, che anche un'altra amina non satura, la allilamina da luogo ad imponenti quadri tossici da parte del sistema nervoso ; un animale anzi presentò dei sintomi che ricordavano tanto quelli della rabbia da dubitare che si fosse trattato per caso di animale rabbioso, ma la ricerca dei corpi di Negri riuscì completamente negativa.

BIBLIOGRAFIA

1) R. LUZZATTO. — Ricerche farmacologiche sulla vinilamina e su alcuni suoi prodotti di trasformazione. — Arch. di Farm. Sper. e scienze affini. — Vol. XVII, 1914.

2) P. EHRLICH. — Ueber die Beziehungen von chemischer Constitution, Vertheilung und pharmakologischer Wirkung (Leyden's Festschrift, 1898).

3) C. LEVADITI. — Experimentelle Untersuchungen ueber die Nekrose der Nieren papille. — Arch. Inter. de Pharmakodynamie, Vol. VIII, 1901.

4) S. GABRIEL. — Ueber Vinylamin. Ber. der deutsch. chem. Gesell. Bd. 21, 1049 e 2664. — Per maggiori particolari relativi alla chimica della vinilamina cf. R. LUZZATTO, Nota 1.

5) W. MARKWALD. — Ueber Dimetylenimim. Ber. der deutsch. chem. Gesell. Bd 33-764.

6) A. DONAGGIO. — Colorazione positiva delle fibre nervose nella fase iniziale della degenerazione primaria e secondaria, sistematica o diffusa del sistema nervoso centrale. — Riv. Sper. di Freniatria. — Vol. XXV, 1904.

7) A. DONAGGIO. — Effects de l'action combinée du jeûne et du froid sur les centres nerveux de mammifères adultes. — Arch. Ital. de Biol. 19.

8) G. VASSALE. — Sulla differenza anatomo-patologica fra degenerazioni primarie e degenerazioni secondarie dei centri nervosi. — Riv. sper. di fren., 1891. Vol. XXII, fasc. 4, 1896.

9) S. STERN. — Die Pathologie der sogenannten « Enzephalitis lethargica ». — Arch. f. Psych. und. Nerv. Bd. 61. — Heft 3.

10) OPPENHEIM. — Lehrbuch der Nervenkrankheiten. — Bd. 1, 1913.

11) C. CENI-BESTA. — Sclerosi in placche sperimentale da tossici aspergillari. Riv. Sper. di Fren. 1905. — Vol. 31.

12) DEL RIO. — I recenti studi su L'Eziologia e la cura della sclerosi a placche. Riv. Sper. di Fren., 1920.

13) G. MARINESCO. — Études sur l'origine et la nature de la sclérose en plaques. — Revue neurologique, 1919, N. 6.

14) KALBERLAH. — Zur Aetiologie der multiplen Sklerose. Deutsch. med. Woch. N. 4, 1921.

15) M. GUGGENHEIM. — Die Biogenen Amine. — Pag. 108. — Springer, Berlin, 1920.

16) F. SELMI. — Sulla esistenza di principî alcaloidici naturali nei visceri freschi e putrefatti onde il perito chimico può essere condotto a conclusioni erronel nella ricera degli alcaloidi venefici. — Memorie Acc. Sc. Ist. Bologna, serie III, tomo II, pag. 81-86.

17) GUARESCHI. — Gli alcaloidi. — Unione Tipografica Editrice Torinese.

18) BRIEGER. — Ueber Ptomaine, Hirschwald Berlin, 1885-86.

19) GAUTIER. — Cfr. Guggenheim, Nota 15.

20) ACKERMANN. — Cfr. Guggenheim, Nota 15.

21) KUTSCHER. — Cfr. Guggenheim, Nota 15.

SPIEGAZIONE DELLE FIGURE

N. 1. — Figura schematica, midollo lombare (cane esper. N. 11).

N. 2. — Figura schematica, midollo dorsale (cane esper. N. 10).

N. 3. — Sezione trasversale, midollo dorsale (cane esper. N. 3). — Metodo Donaggio, ematossilina stannica — Himmler — Oc. 1 — obbiet. 7. — Appaiono colorate diffuramente in nero nella tavola e in rono nel preparato solo le fibre degenerate.

N. 4. — Midollo lombare sezione trasversale (cane esper. N. 11). — Metodo Donaggio,

ematossilina ramica — Himmler — Oc 4. — obbiet 7. — Le fibre lese sono colorate in nero, grigio.

N 5. — Midollo lombare-sezione longitudinale (cane esper. N. 10). — Metodo Donaggio, ematossilina ramica. — Himmler — Oc. 4 — obbiet. 7. — Le goccie seriali colorate in nero rappresentano le fibre lese.

N. 6 — Midollo dorsale, Sezione trasversale (cane esper. N. 3). — Metode Weigert-Pal — Himmler — Oc. 3 — obbiet. 1. — Nella sostanza bianca appaiono scolorate le zone di rarefazione.

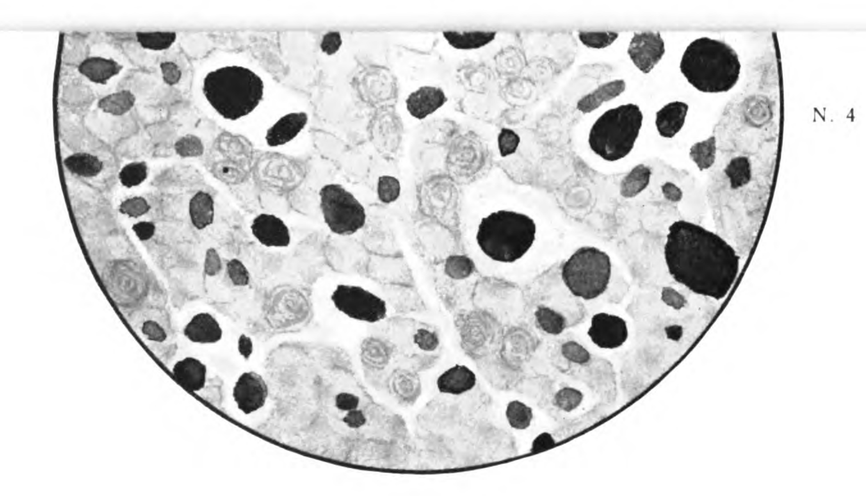
N. 7. — Cellula del midollo dorsale (cane esper. N. 11). — Metodo III Donaggio per il reticolo neurofibrillare endocellulare. — Himmler — Oc. Comp. 6 — obbiet. immers. omog. 1,8. — Si nota la scomparsa del reticolo neurofibrillare, endocellulare e conglutinazione.

N. 8. — Cellula del midollo dorsale (cane esper. N. 11). — Metodo III° Donaggio per il reticolo neurofibrillare endocellulare. — Himmler — Oc. Comp. 6 — obbiet. immers. omog. 1,8. — Tipo di modificazione iniziale con ispessimento periferico del reticolo neurofibrillare endocellulare.

R. LUZZATTO. — A LEVI. Lesioni del sistema nervoso nell' avvelenamento per vinilamina.

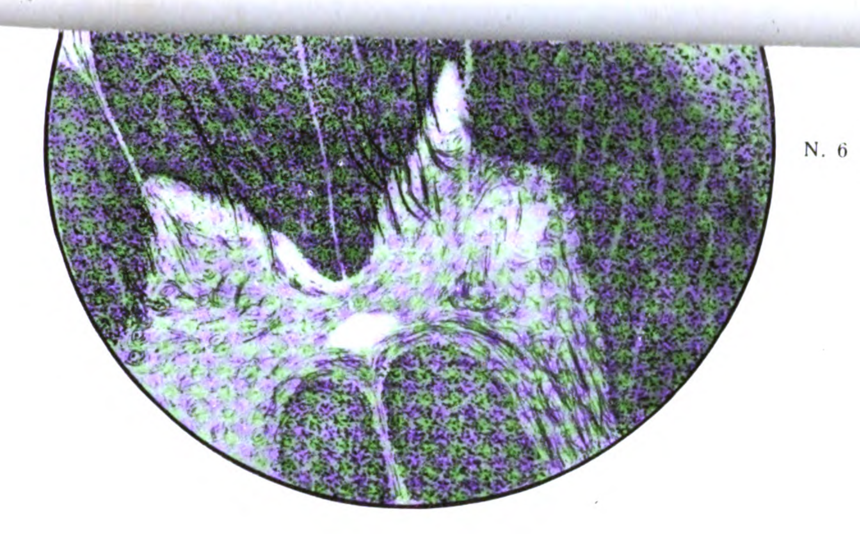
M. Botti, dis.

N. 4



M. Botti, pinx

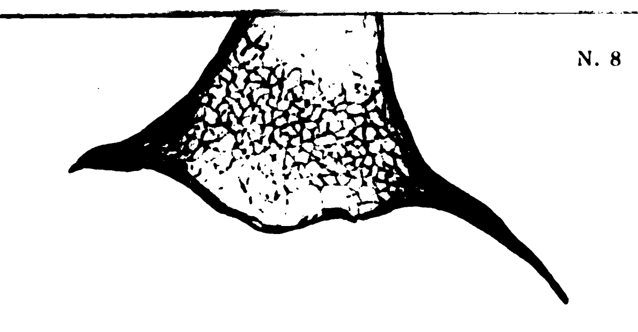
R. Luzzatto. — A. Levi. — Lesioni del sistema nervoso nell' avvelenamento per vinilamina.



N. 6

M. Botti, pinx.

N. 8



M. Botti, pinx.

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE GÉNÉRALE
ET DE LA STATION PHYSIOLOGIQUE DU COLLÈGE DE FRANCE (PARIS).
Directeur : Professeur E. GLEY.

Les phénomènes d'avitaminose sont-ils modifiés par l'administration d'histamine chez le rat blanc ?

par

LOUIS BOYENVAL.

I. — INTRODUCTION.

Nous avons poursuivi sur le rat blanc des recherches analogues à celles que KOSKOWKI a effectuées sur le pigeon relativement à l'effet de l'histamine sur les animaux soumis à un régime alimentaire privé de « vitamines ».

Notre but était le même : rechercher si l'histamine est capable d'amender ou même de supprimer les accidents de la carence, l'histamine étant, comme l'ont constaté divers auteurs, un excitant des sécrétions digestives. Ces expériences posent donc la question de savoir si du défaut de ces sécrétions dépendent, comme on l'a prétendu, les phénomènes d'avitaminose.

II. — MATÉRIEL.

Six rats blancs de même portée, nés le 13 avril 1921 au Laboratoire, sont soumis à un régime alimentaire normal jusqu'au 27 mai, jour où l'expérience commence.

A ce moment les poids sont les suivants :

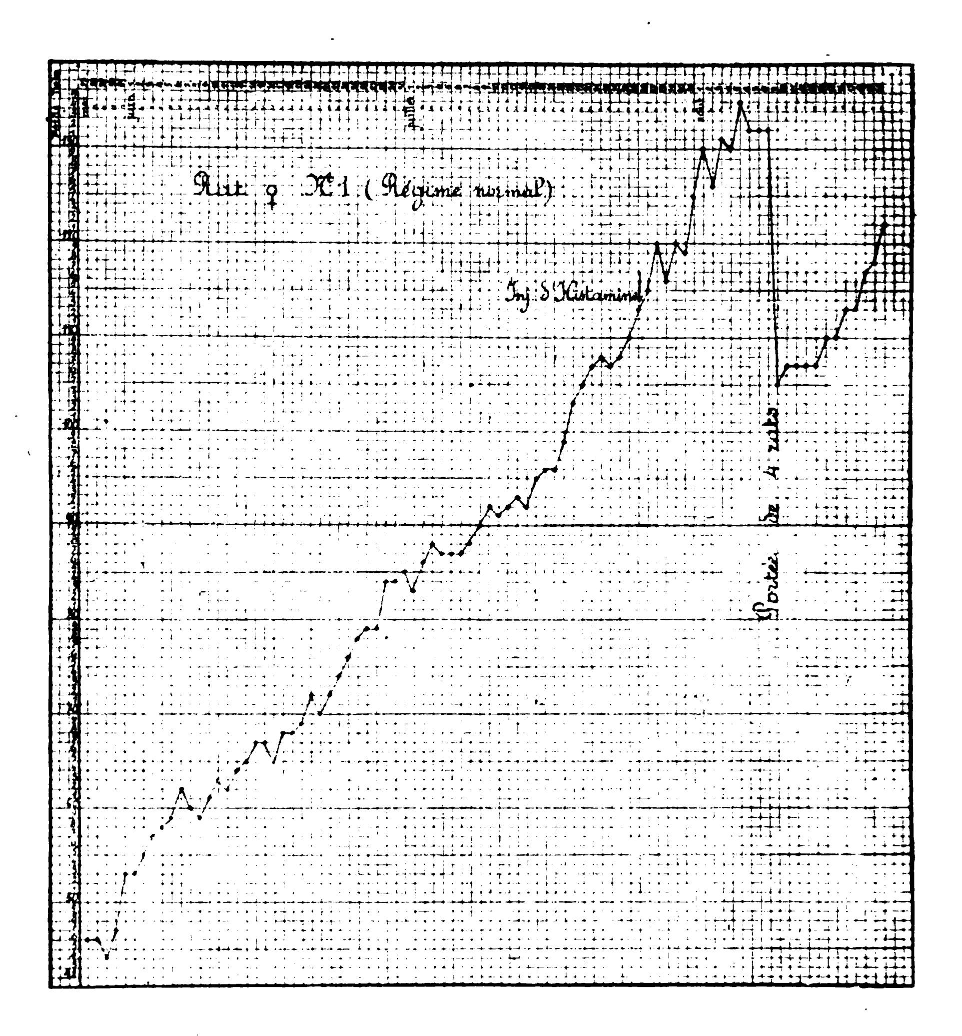
N° 1	40 gr.
N° 2	46 gr.
N° 3	47 gr.
N° 4	53 gr.
N° 5	52 gr.
N° 6	38 gr.

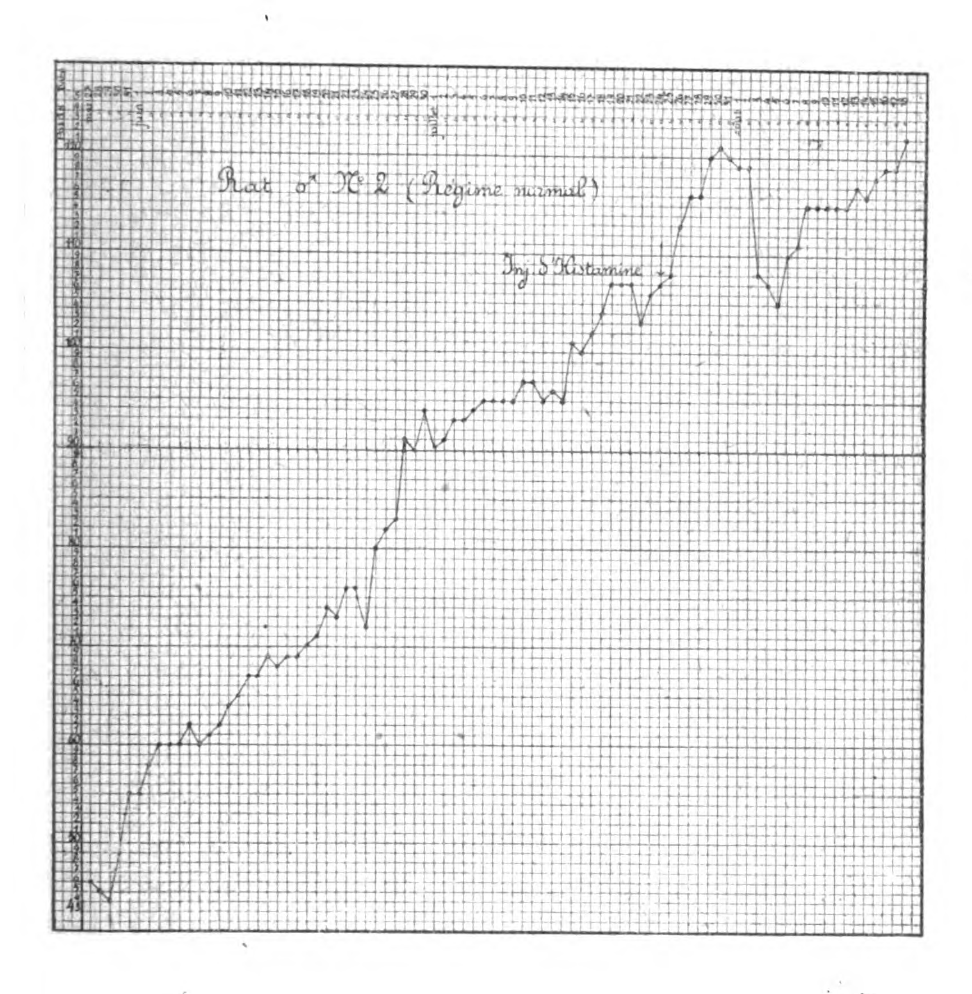
Les N° 1 et 2 sont conservés comme témoins et reçoivent une nourriture variée, les quatre autres sont mis au régime du riz poli.

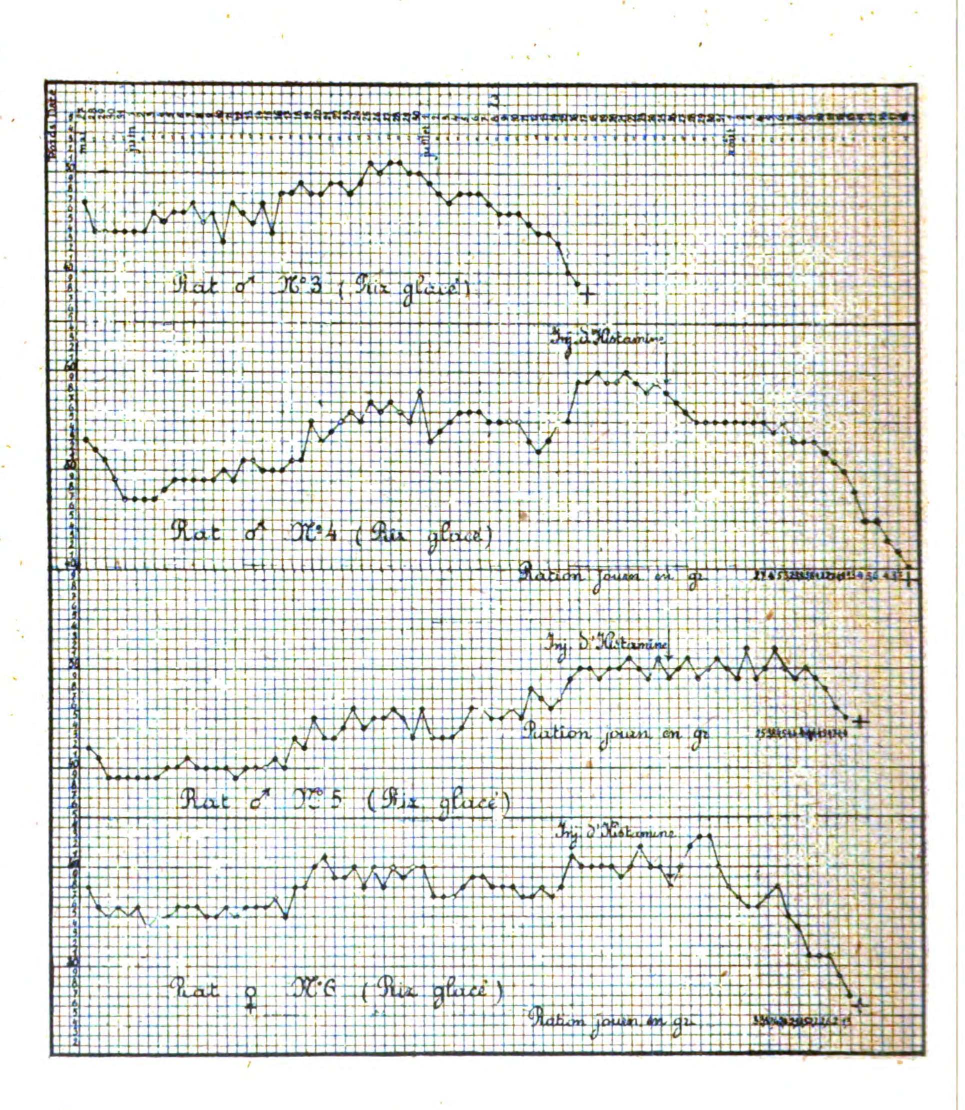
Tous se trouvent dans des conditions d'existence rigoureusement identiques

(température — soins divers), ils reçoivent une ration plus que suffisante déterminée après chaque journée, et sont pesés tous les jours à la même heure.

Les nombres ont servi à établir les trois graphiques ci-dessous, la ration n'a été indiquée que pour les derniers jours




Rat ♂ N° 2 (Régime normal)
Inj. d'Histamine
juin
juillet
août


Rat ♂ N° 3 (Riz glacé)
Inj. d'Histamine
Rat ♂ N° 4 (Riz glacé)
Ration jouen. en gr.
Inj. d'Histamine
Ration jouen. en gr.
Rat ♂ N° 5 (Riz glacé)
Inj. d'Histamine
Rat ♀ N° 6 (Riz glacé)
Ration jouen. en gr.

III. — DISCUSSION.

Les courbes relatives aux pesées aussi bien que les phénomènes observés nous conduisent à instituer dans la discussion trois points successifs et qui concernent

a — les témoins 1 et 2.
b — le nº 3 — poids et accidents.
c — les nºs 4, 5 et 6.

a) *Témoins.* — Considérons les courbes de leurs poids, au 1er juillet ; ils ont augmenté très régulièrement, le mâle de 44 g. et la femelle de 36 g. La courbe de la femelle présente la convexité caractéristique dite « phase de creusement », mise en évidence par plusieurs auteurs (HOUSSAY, PÉZARD) et correspondant à la maturation de l'ovaire. — Cette femelle, laissée avec le mâle, a été couverte et a mis bas le 9 août (4 petits). — A un certain moment nous avons injecté au nº 2 de l'histamine et durant 26 jours (voir courbe) ; il ne nous semble pas que cette substance ait produit grand effet sur la croissance de l'animal, sauf peut-être une chute accidentelle de poids, aussitôt compensée.

b) *Le nº* 3. — Le nº 3 nous a servi d'indicateur carencé. Notre intention était, en effet, d'injecter l'histamine au moment où se déclancheraient les accidents de l'avitaminose. Or, des expériences précédentes nous avaient enseigné que, dans une série homogène mise au riz poli, les désordres pathologiques apparaissent à peu près au même moment, à trois ou quatre jours près.

Le nº 3 est carencé le premier. — Le 18 juin le pénis est sorti et passe peu à peu du rose au violet. Jusqu'au 29 juin l'animal conserve un poids constant, sauf une légère montée momentanée ; malgré cela il est maigre, les os des vertèbres sont très apparents, bien que l'animal ingère par jour 3 g. de riz poli. Dès le 29 juin commence la diminution du poids qui coïncide avec le début des accidents — l'animal marche péniblement les pattes en extension — ; le 12 juillet le train de derrière semble paralysé — l'animal tombe parfois sur le flanc — ; le 16, la respiration devient très pénible, l'animal meurt ; — durée de la crise : 2 heures avec des intervalles de répit.

La diminution de poids a été de 14 g. en 18 jours, soit 0,73 g. par jour, A l'autopsie : estomac vide, le duodénum et partie de l'intestin grêle renfermant du sang non coagulé ; poumons très congestionnés.

c) *Injection d'histamine.* — A ce moment les rats 4-5-6 ne présentent encore aucun trouble nerveux, mais nous avons lieu de croire que les accidents ne vont pas tarder à se manifester, car le

pénis est sorti et violacé Nous les soumettons alors au traitement suivant :

Injection de 5/10 cm³ d'eau salée contenant 0,0001 g. d'histamine. — Rappelons que ce corps (POPIELSKI, KOSKOWSKI) augmente la sécrétion gastrique et accessoirement quelques autres sécrétions digestives.

Les injections commencèrent le 25 juillet. Elles n'ont pas influé sur la croissance de l'animal. — La période de déchéance, si caractéristique chez l'indicateur (n° 3), a débuté presque aussitôt et s'est poursuivie normalement.

Les n° 4 et 6 sont conservés jusqu'à la mort ; le n° 5 est sacrifié un peu avant pour nous fournir du matériel pour l'étude des sécrétions digestives ; nous donnons ici le tableau de la chute de poids comparée avec celle du n° 3.

	Chute de poids en gr.	Durée de la chute (en jours)	Chute moyenne quotidiene en gr.
N° 3	14	18	0,73
N° 4	15	14	1,07
N° 6	16	15	1,06
N° 5 (a été sacrifié)	7	7	1,00

Comme dans les expériences de KOSKOWSKI sur le pigeon, l'histamine, loin d'amender la chute de poids, paraît, au contraire, l'avoir accélérée.

Le n° 6 meurt le 12 août, le n° 4 meurt le 18 août, et le n° 5 se fut éteint probablement à cette dernière date si nous ne l'avions sacrifié. Cela prouve, en tout cas, que l'injection d'histamine n'empêche pas a mort rapide.

Par contre, *aucun des rats injectés ne présenta les troubles nerveux observés sur le n° 3 et préalablement sur une série de 10 autres rats*. — Les n°s 4 et 6 s'éteignirent paisiblement, le n° 4 sur le plateau de la balance au cours de la pesée. — L'histamine a-t-elle produit son effet physiologique ? Nous le pensons, car à l'autopsie : 1° l'estomac de ces 3 animaux était plein et très dilaté dans la région du cardia ; cette dilatation peut avoir pour cause, soit le non fonctionnement de l'organe, soit une hyperchlorhydrie ; 2° nous avons constaté que le contenu était très acide. — D'autre part du suc des glandes salivaires broyées de ces animaux s'est montré très amylolytique.

CONCLUSIONS.

1° L'injection d'histamine, excitant des glandes digestives, chez des rats qui sont soumis depuis quelque temps au régime du riz poli, ne provoque aucune modification dans l'évolution cachectique de ces animaux.

2° Par contre, sous l'influence de l'histamine, les accidents nerveux, qui précèdent la mort des rats mis au régime du riz poli, ne se produisent pas ; l'histamine paraît donc posséder une action antinévritique.

TRAVAIL DU LABORATOIRE DE BIOLOGIE GÉNÉRALE ET DE LA STATION PHYSIOLOGIQUE DU COLLÈGE DE FRANCE (PARIS).

Directeur : E. GLEY.

L'Action antinévritique de l'histamine chez les pigeons nourris au riz poli.

PAR

W. KOSKOWSKI.

I. — INTRODUCTION.

Si le rôle des facteurs accessoires de l'alimentation des vitamines est en grande partie connu, il n'en est pas de même du mode d'action de ces substances.

On a soutenu récemmment (A. LUMIÈRE surtout) que, contrairement à l'idée dominante, il n'existe en réalité aucun facteur qui aide à la croissance et maintienne l'équilibre des organismes. Les vitamines ne seraient pas autre chose que des corps stimulant les glandes à sécrétion externe et des facteurs supplémentaires maintenant le tonus de l'appareil digestif. L'absence de ces corps occasionnerait celle de la sécrétion des sucs digestifs, et, par conséquent, une stase alimentaire ; la mort surviendrait par inanition à cause de l'impossibilité d'assimiler la nourriture. Avant la mort apparaissent des crises d'origine cérébelleuse ; celles-ci résulteraient de l'anémie des centres, conséquence de l'inanition.

Si ces vues sont exactes, toute substance qui stimule des glandes à sécrétion externe (glandes gastriques par exemple), et qui pourrait par conséquent permettre l'assimilation du riz poli devrait retarder ou même empêcher les accidents de la carence. Elle remplacerait alors les vitamines, puisqu'elle serait capable d'exciter la sécrétion, et elle remplacerait surtout le facteur B, qui joue un rôle fondamental dans les oxydations organiques.

A ce point de vue, nous avons expérimenté avec la β-imidazolyléthylamine. Les expériences de POPIELSKI et ensuite celles de ROTHLIN et GUNDLACH sur le chien, de STEUSING et les miennes sur différents

vertébrés, particulièrement sur des oiseaux (poules, oies, canards, pigeons), ont démontré qu'après injection sous-cutanée cette substance provoque une forte sécrétion gastrique.

II. — MATÉRIEL.

Nous avons essayé les effets de cette substance sur des pigeons nourris au riz poli. Mes expériences ont été faites pendant l'été sur 12 sujets ; les pigeons étaient dans des cages en plein air à la Station Physiologique, au Parc des Princes, et mis au régime du riz poli. — Chez 7 d'entre eux nous avons injecté de l'histamine à la dose de 0 gr. 0004 dans 0 $cm^3$5 d'eau physiologique stérilisée. Les n°s 1, 2, 3, 4 furent injectés dès le 1er jour, le n° 5 à partir du 10me, le n° 6 du 16me et le n° 12 depuis le 20me jour. Les n°s 7, 8, 9, 10, 11, 12 furent conservés comme témoins en avitaminose. Nous avions constaté préalablement que l'injection répétée d'histamine ne trouble pas la nutrition ni l'état général du pigeon normal.

III. — RÉSULTATS.

A). *Le poids et la durée de la vie.* — Le temps pendant lequel *tous* nos sujets furent nourris avec du riz poli peut être divisé en trois périodes, aussi bien chez ceux qui recevaient l'histamine que chez les témoins :

1). Dans la première période qui dure 7 ou 8 jours, le poids du corps est resté plus ou moins invariable, à part les trois sujets à poids élevé qui ont présenté une chute très marquée le 1er jour. Cette constance avait déjà été observée par Mlle NOVARO ; celle-ci n'a rien remarqué d'anormal dans le poids, ni dans les phénomènes chimiques, ni dans la déperdition de chaleur pendant la première période (7 à 13 jours) de l'alimentation avec du riz poli.

2). La deuxième période est caractérisée par la diminution progressive du poids du corps.

3). Dans la troisième période nous remarquons une perte absolue de l'appétit : les pigeons refusent la nourriture ; cette période commence 3 ou 4 jours avant la mort ; chez les témoins elle coïncide en général avec la période des crises paralytiques.

Quoique la quantité moyenne du riz poli mangé par les pigeons recevant l'histamine fût plus élevée que chez les témoins, la diminution progressive du poids du corps fut plus considérable que celle des témoins. Les courbes jointes à notre travail l'indiquent nettement. On trouvera, en outre, dans le tableau ci-dessous les chiffres moyens de la perte du poids chez les deux séries des sujets. Nous y avons joint les données relatives à la durée de leur vie ; on voit que la différence entre les pigeons recevant l'histamine et les témoins fut insignifiante à cet égard.

TABLEAU.

	Pigeons recevant riz poli-histamine	Témoins
Durée moyenne de la vie	26.7 jours.	24.6 jours.
Quantité moyenne de riz poli employé chaque jour comme nourriture	15.7 gr.	13.7 gr.
Perte absolue du poids	1/2.6 du poids primitif.	1/3
Perte de poids quotidienne	5.33 gr.	4.26 gr.
Perte de poids par kg. et par heure	0.61 gr. (Inanition — 1,73 (Ch. Richet).	0.48 gr.
Perte proportionnelle quotidienne	0.014 gr. (Inanition — 0,044 (Chossat).	0.0122 gr.

Ces chiffres montrent que l'histamine, en augmentant la sécrétion des sucs digestifs, a stimulé les processus vitaux des tissus ; d'où un épuisement plus rapide, l'organisme n'ayant pas trouvé dans le riz poli les substances nécessaires à sa reconstitution.

Courbe représentant la diminution progressive du poids du corps chez 12 pigeons nourris au riz poli, 7 pigeons recevant des injections d'histamine.

a) ligne noire — pigeons nourris au riz poli et recevant des injections quotidiennes de 0,0004 gr. d'histamine.

b) ligne pointillée — les témoins.

c) ligne pointillée mixte — un pigeon qui, malgré des injections d'histamine à partir du 10me jour d'expérience, a présenté des troubles nerveux.

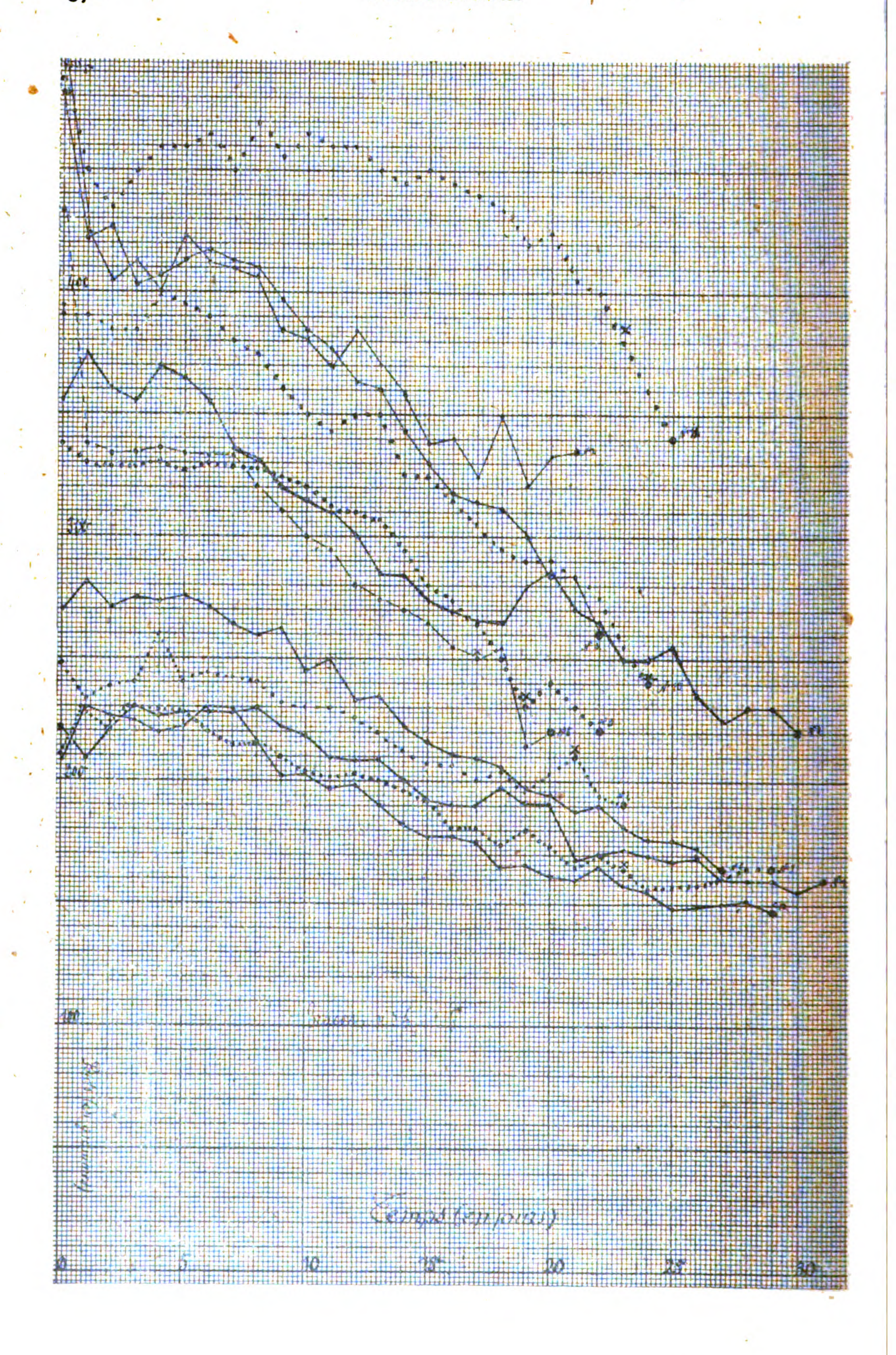
d) le commencement des troubles nerveux.

e) la mort.

B) *Les autopsies.* — Les pigeons qui recevaient des injections quotidiennes d'histamine furent capables de digérer le riz poli. A l'autopsie on trouvait l'estomac vide, ou bien quelquefois rempli d'un liquide acide ; les intestins étaient vides ou bien contenaient une masse fluide d'une couleur jaune-verdâtre. La muqueuse du tube digestif était en général hémorrhagique. La masse des excréments à demi désséchés qui atteint 10 à 14 gr. par 24 heures à l'état normal et pendant les premiers jours de l'alimentation au riz poli, baisse le 3me, 4me ou 5me jour jusqu'à 2 gr. et se maintient ensuite entre 1 à 2 gr.

C) *Les accidents nerveux.* — En ce qui concerne l'état nerveux des pigeons recevant l'histamine, nous pouvons grouper les effets observés en deux catégories :

a) Nos sujets qui ont reçu des injections d'histamine n'ont présenté aucun trouble nerveux pendant toute la durée des expériences. L'inanition seule paraissait causer la mort. Notons toutefois que, chez le N° 5 qui a été injecté dès le 10me jour du régime, il y a eu néanmoins quelques faibles accidents nerveux.



b) Les injections d'histamine faites aux pigeons qui présentaient déjà des crises paralytiques, n'ont donné aucune amélioration.

D) Le quotient respiratoire qui au début se rapproche de l'unité, baisse, selon RAMOINO, jusqu'à 0,34 au moment où commence la polynévrite. Les expériences de M. CARIDROIT ne paraissent pas confirmer une diminution aussi considérable, surtout chez les pigeons recevant des injections d'histamine.

E) *Les troubles mécaniques.* — Il résulte des faits précités que les pigeons nourris au riz poli et recevant l'histamine ne présentent pas de phénomènes nerveux, c'est-à-dire des mouvements caractéristiques de la tête, des crises paralytiques, etc. Ces pigeons perdent quelquefois l'équilibre pendant les derniers jours de leur vie quand on les oblige à marcher, et cela d'autant plus facilement qu'ils sont fatigués. Le même effet se présente quelquefois quand ils veulent exécuter des mouvements intentionnels. On peut expliquer ce fait par une fatigue purement musculaire qui rend impossible la position naturelle du pigeon debout par rapport à son centre de gravité (1) placé un peu en avant.

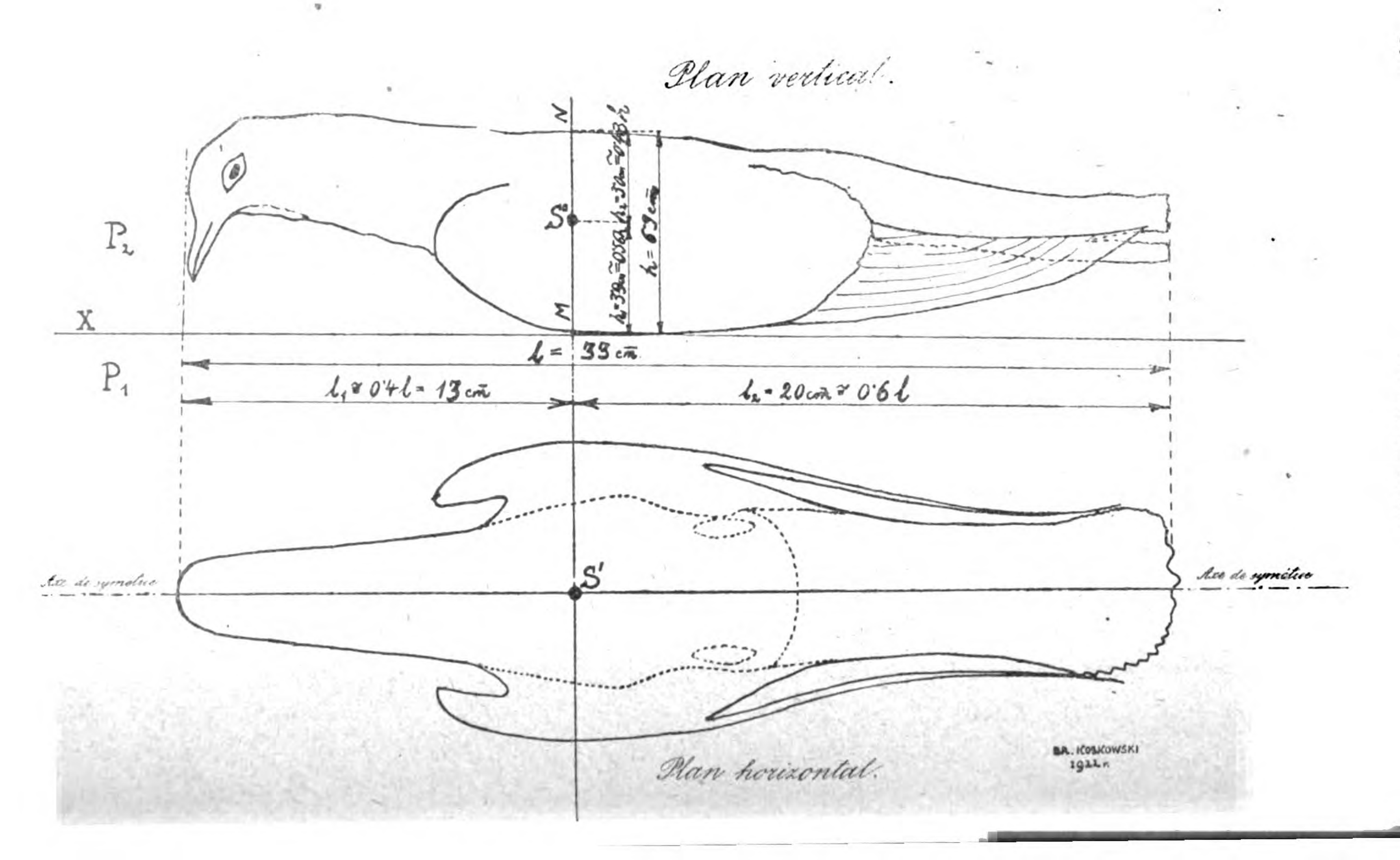
IV. — DISCUSSION.

Les pigeons nourris au riz poli et recevant l'histamine paraissent mourir d'inanition et, en général, dans le même espace de temps que les témoins. Cependant un excitant des glandes gastriques, et indirectement des autres glandes digestives, leur a été fourni. Et cet excitant s'est bien montré actif dans nos expériences, puisque nous avons constaté une augmentation d'acidité du suc gastrique. Nous ne pouvons imputer la carence à l'absence des sécrétions digestives. A notre avis, la perte du poids et les accidents sont dus à l'absence d'une substance plastique qui fait défaut dans le riz poli et qui

(1) *Détermination du centre de gravité d'un pigeon.* — Le centre de gravité d'une masse ayant une certaine forme peut uniquement être déterminé en suspendant cette masse sur un fil attaché à un certain point. Le prolongement du fil tendu passe par le centre de gravité, lorsque le corps est en équilibre. On répète l'expérience en suspendant la masse successivement par deux autres points. Le point d'intersection des trois plans ainsi obtenus détermine le centre de gravité.

Le centre de gravité du pigeon fut déterminé par méthode expérimentale par BR. KOSKOWSKI jun. On suspendait au moyen d'un fil un pigeon chloroformé par un point (une patte par exemple) et on déterminait sur lui la direction de la verticale. Dans le cas de la suspension du pigeon par la queue ou par la tête, le plan vertical passait (ce qu'on pouvait prévoir) par l'axe de symétrie du pigeon (voir figure). L'intersection de ces deux plans nous donne une ligne droite qui, sur la projection horizontale, donne le point S', et sur la projection verticale la droite M N. Enfin, pour déterminer à quelle hauteur de cette droite se trouve le centre de gravité, on suspendait le pigeon par un troisième point : par une aile qui se déploie sur l'action du poids du pigeon. Nous avons ainsi obtenu sur la projection verticale un troisième point S'', représentant la hauteur du centre de gravité au-dessus du plan horizontal.

On a choisi sur le pigeon la figure d'une « station assise », car, après la suspension


Plan vertical.
N
S
M
P2
X
P1
l = 33 cm
l1 = 0·4 l = 13 cm
l2 = 20 cm = 0·6 l
S'
Axe de symétrie
Axe de symétrie
Plan horizontal.
BR. KOSKOWSKI
1922 r.

vient du péricarpe. En effet, le riz poli possède en quantité suffisante des substances énergétiques, tandis qu'il ne peut pas satisfaire le besoin de substances plastiques indispensables à la réparation des tissus. Le superflu d'amidon augmente du reste les fermentations intestinales et provoque l'augmentation du péristaltisme.

Il n'en est pas moins vrai que, comme certaines autres substances, l'histamine a fait disparaître les troubles nerveux dans ce qu'on a appelé l'avitaminose des pigeons. Si ces troubles ne se produisent pas, c'est parce qu'il y a probablement une oxydation complète des substances alimentaires résultant de l'action des sucs digestifs ; les substances toxiques qui se forment par oxydation incomplète disparaissent des tissus.

V. — CONCLUSIONS.

1) L'histamine supprime les phénomènes nerveux chez les pigeons nourris au riz poli. En augmentant la sécrétion du suc gastrique ainsi que son acidité elle facilite la digestion complète du riz.

2) L'histamine ne remplace pas les vitamines ; quoique ce corps représente un fort stimulant des glandes digestives (glandes gastriques surtout), les pigeons nourris au riz poli et recevant des injections sous-cutanées d'histamine meurent par suite de manque de substances azotées.

Je tiens à exprimer à M. le professeur GLEY et à M. A. PÉZARD ma vive reconnaissance pour le bienveillant concours, qu'ils ont bien voulu m'offrir.

---

il prend plus ou moins cette situation. Le cou est le plus possible allongé et plus ou moins sur le prolongement de la ligne du dos. C'est ainsi qu'il faut mesurer les coordonnées du centre de gravité qui sont données sur la figure et que nous allons décrire :

Si l'on appelle l — la longueur du pigeon, le centre du pigeon se trouvera plus ou moins à une distance à 0,4 × l (sur le dessin l = 0,4 l) du bec, ou à une distance 0,6 × l de la queue; sur une perpendiculaire à l'axe de symétrie et à une hauteur de 0,56 × h au-dessus de l'horizontale, si on appelle h — la hauteur du pigeon à cet endroit, c'est-à-dire à une distance 0,4 l de la tête et 0,6 l de la queue. Ce sont là les deux coordonnées, la troisième est inutile — le pigeon est symétrique.

R° ISTITUTO DI STUDI SUPERIORI DI FIRENZE. LABORATORIO DI MATERIA MEDICA, DIRETTO DAL PROF. G. CORONEDI.

Contributo allo studio farmacologico dell' emetina.

(Nota II[a]).

DOTT. PIETRO-MARIA NICCOLINI

(Assistente).

Azione dell' Ipecaquana e dell' Emetina sulla muscolatura liscia intestinale.

Sul finire della mia precedente nota sull' emetina (1), alludendo ad alcune esperienze di orientamento riferentisi alle proprietà emostatiche di questo alcaloide, mi lasciavo aperto l'adito per tornare su quel tema allo scopo di renderlo più completo, sia approfondendo lo studio della relativa bibliografia, sia eseguendo esperienze che dessero luce su tale argomento: ma siccome quello è ancora lungi da esser pronto per la pubblicazione, così ho creduto opportuno di fargli precedere la presente nota, diretta a meglio rilevare alcune particolarità farmacologiche dell' azione dell' emetina e dell' ipecaquana sull'intestino, il quale, sia clinicamente che anatomo-patologicamente, si dimostra l' apparato più sensibile di fronte a questi farmaci. Siccome poi tanto il substrato anatomico intestinale come quello vasale è riccamente fornito di muscolatura liscia, penso che la precedenza di questo studio sull' altro potrà eventualmente prestarsi ad utili confronti, atti a meglio chiarire il modo di agire di queste sostanze.

E' noto che la droga fu introdotta in Europa proprio per le sue virtù antidissenteriche, e pur non disconoscendo che aveva un' azione più sicura sulle dissenterie tropicali, che sulle forme indigene, pure tutti gli AA. tanto antichi che moderni concordano nel rilevarne i benefici anche nelle nostre forme endemiche: ed è certo d'altra parte, che in Europa — almeno avanti la guerra — solo una proporzione piccola di forme dissenteriche era di etiologia amebica. Sorge quindi spontanea l' idea, che l' efficacia della droga in simili forme non sia legata solo alla sua virtù antiparassitaria, ma anche a qualche altra azione, che si svolga probabilmente sull' intestino malato.

Scorrendo libri ormai non più moderni, si riscontra accennata

la constatazione di questa proprietà: ma alcuni mostrano di non comprenderla, altri tentano spiegarla in vario modo. GIACOSA (2) p. es., constatando che le dosi tossiche causano irritazione fortissima della mucosa enterica, concede che le piccole dosi terapeutiche possano produrvi una irritazione benefica, che agevolerebbe la guarigione. HUSEMANN (3) attribuisce il potere antidissenterico all' acido ipecaquanico, mentre l' emetina, secondo l' A., provoca la diarrea. Anche il CANTANI (4) è della stessa opinione, e si esprime in questi termini: « *Sull' intestino le piccole dosi non sogliono avere alcuna azione: qualche volta riescono piuttosto stitiche, ciò che altre volte, ma non giustamente si spiegava per una azione antiperistaltica dell' ipecaquana, ma veramente sembra dovuto semplicemente alla preponderanza dell' influenza — in queste piccole dosi — dell' acido ipecaquanico astringente, nel che l' ipecaquana presenterebbe una graziosa analogia col rabarbaro, il quale se nelle dosi maggiori certamente promuove diarrea, nelle minori per l'azione prevalente dell' acido reotannico produce stitichezza di corpo.* » Poche pagine dopo però l'A. tiene ancora in minor conto l'azione dell' ipecaquana nel catarro cronico ed acuto dell' intestino, ritenendo che giovi solo ed in quanto viene associata all' oppio.

Credo, per parte mia, il disaccordo di alcuni autori con la maggioranza degli altri imputabile più ad una insufficente valutazione del fattore dose, che ad altro: come sullo stomaco le dosi moderate agiscono quali stimolanti eupeptiche, e le forti quali emetiche, così nessuna meraviglia se in dosi giuste l'ipecaquana è capace di rimettere in regola un intestino diarroico, nonostante che dosi tossiche producano l'effetto diametralmente opposto. Più interessante mi sembra il passare in rassegna i varî elementi della droga, cui è stato voluto attribuire ora l'una ora l'altra proprietà terapeutica. L'azione antidissenterica — ho già detto — viene da alcuni attribuita all' acido ipecaquanico, acido che si ritiene abbia la costituzione di glucoside: SOULIER (5) esclude che tale azione spetti all' amido, che, sebbene contenuto in considerevole quantità, è sempre troppo poco per dare ragione dell' efficacia. « *Non può che trattarsi evidentemente,* prosegue l'A., *di una modificazione locale della mucosa ammalata, prodotta dal contatto della ipecaquana con la mucosa intestinale; non bisogna invocare né una azione evacuante, né una irritazione sostitutiva, la dose efficace potendo essere minima.* » All' alcaloide principale per molto tempo non si è attribuito altro valore che l'emetico, così che alcuni AA. (HARRIS, KANTHACK, CADDY, V. in 6) proposero di usare la radice disemetinizzata per evitare il vomito: va osservato però, che dopo l'abbandono della cura della dissenteria amebica con alte dosi di ipecaquana secondo il metodo brasiliano, tale precauzione è per lo meno inutile — data la minima quantità di emetina che si introduce — se non forse dannosa, non potendosi ormai escludere, come si faceva per l'addietro, che anche al di fuori dell' amebiasi, tracce di questo alcaloide influenzino beneficamente l'intestino malato.

Non volendo proseguire oltre una rassegna di opinioni e non di fatti, mi piace terminarla constatando la ingenuità della manía analitica dell' uomo, mi si permetta la parola. Fra le righe dei vari libri sfogliati, mi pare quasi di intravedere il dispiacere di non aver tanto in mano, da poter raccogliere l'azione complessa della droga sotto uno schema, che attribuisca ai singoli costituenti una azione netta e precisa : ma la natura invece a traverso le cellule di una pianta compie delle sintesi ben più mirabili e più perfette, e sebbene un costituente abbia maggiore azione in un senso, un altro in un altro, gli uni sono spesso un complemento degli altri, e modificano reciprocamente le angolosità dell' azione — mi si passi la figura — dei principî concomitanti nella stessa droga : ciò che oggi in pratica andiamo riconoscendo col riporre in onore i vecchi preparati galenici, sia pure con un vestito che li renda più pratici.

Pur tuttavia l' analisi è necessaria per interpretare meglio la sin tesi, e molto utili sono certamente i confronti delle azioni svolte da un solo costituente, comparate a quelle svolte dalla droga integra, e privata di quell' elemento. Qualche studio in questo senso è stato fatto nel campo clinico : HUERRE (7) dai dati contradittorî dei varî lavori desume che l'emetina e l'ipeca totale convengono al trattamento della dissenteria amebica ; che invece sembrano controindicate nelle sintomatologie bacillari, dove avrebbe maggiore efficacia l'ipecaquana priva degli alcaloidi, associata però alla sieroterapia. WEILL (8) invece ha ottenuto effetti sorprendenti con l'emetina in alcune forme dissenteriche banali, non protozoarie.

La stessa incertezza che regna su tale argomento nel campo clinico, regna del pari nel campo farmacologico relativo. Quale differenza intercorre fra l' azione dell' ipecaquana integrale, dell' emetina, dell' ipecaquana priva di alcaloidi, dell' acido ipecaquanico, dell'ipecaquana priva di questo glucoside sopra la muscolatura intestinale, tanto per citare uno dei numerosi campi di azione, che più da vicino ci interessa in questo momento ? Io non ho trovato nella bibliografia studî farmacologici diretti a questo scopo, intesi cioè a chiarire le modificazioni di comportamento relative alle modificazioni apportate nella composizione della droga.

Nel riferire queste esperienze ho la coscienza di non fare altro che sfiorare un sì vasto argomento, limitandomi a notare le diversità di azione della droga in confronto al suo alcaloide principale, alla droga priva di alcaloidi, alla soluzione del complesso delle sostanze, prevalentemente alcaloidi, estratte dalla medesima ; giacché poi mi se ne presentava la possibilità, ho avuto agio di confrontare in alcune esperienze il diverso comportamento di due differenti campioni della stessa droga. In ultimo dedicherò alcune ricerche a lumeggiare il meccanismo di azione dell' ipecaquana e dell' emetina.

Gli esperimenti sono stati così condotti ; un tratto di intestino di

circa tre cm. di lunghezza, tolto dall' animale (cavia, topo, gatto) appena ucciso per dissanguamento, viene fissato alle due estremità maltrattandolo il meno possibile, rispettando il suo contenuto che gli serve da stimolo fisiologico: un estremo in basso è raccomandato ad un uncino fisso, l'altro superiormente trasmette alla leva dell' ENGELMANN i movimenti causati dall' allungamento od accorciamento del tratto intestinale medesimo. Si è tenuto conto di quale tratto di intestino veniva usato in ogni esperienza, e premettiamo fin d' ora che non abbiamo riscontrato diversità apprezzabili fra i varî segmenti nel modo di rispondere ai diversi stimoli: abbiamo solo da segnalare la constatazione, non però costante, di una differenza nella forma della contrazione dell' intestino tenue in confronto a quella del crasso: nel primo caso la grafica registra semplicemente una ascesa ed una discesa che rappresentano tutta la contrazione, nel secondo la ascesa è rapida e continua, ma il rilasciamento è molto più lento ed interciso, perché la decontrazione procede quasi direi a tappe, descrivendo sul tracciato una linea a zig-zag; tale osservazione però non si è notata sempre. Appena applicato l'intestino all' apparecchio, lo si immerge in un cilindro contenente liquido di RINGER ossigenato, tiepido a circa 38°-40°; il cilindro, in cui poi vengono aggiunte le sostanze da esperimentare, ha la capacità di circa 150 cc.

Durante le prime esperienze ho notato la necessità di escidere il mesenterio in tutta vicinanza della sua inserzione sull' intestino, perché la penna risenta e trascriva esattamente le contrazioni, altrimenti il mesenterio si tende fra i due punti di attacco, e l'intestino, che ne è più lungo, è libero di contrarsi senza che la penna registri completamente i suoi movimenti. Qualche volta, dopo una prova, si è rapidamente sostituito il bagno medicato con uno normale, allo scopo di non mescolare nello stesso liquido farmaci diversi, di cui poi sarebbe stato più difficile sceverare la singola azione. Tal metodo però riscontrai esser causa di maggiori errori, che non la sovrapposizione nello stesso liquido di farmaci diversi: infatti ho constatato, che dopo la esposizione per quanto breve di un organo all' aria, la sensibilità all' azione dei farmaci è alterata, qualche volta anche in modo considerevole; invece l'organo, separato dall' animale avverte bene le modificazioni ambientali, ma molto presto vi si assuefà, così che all' aggiunta di una nuova sostanza, la presenza nel bagno di una sperimentata precedentemente non altera la grafica in modo apprezzabile, purché ben inteso, la prima non abbia oltrepassato i confini di una reazione fisiologica.

IPECAQUANA. — Premesse queste dilucidazioni di indole generale, passo allo studio particolareggiato delle sostanze sopra ricordate, e comincio da quelle esperienze che lumeggiano meglio le modificazioni della motilità intestinale indotte dall' infuso di ipecaquana. Avverto a questo proposito che sono state provate due qualità di polvere di

ipecaquana: la prima è un campione molto vecchio, che si trova da anni nel museo dell' Istituto, la seconda procurata di recente. La prima è una polvere impalpabile, di colore giallo crema, di aspetto uniforme, che messa nell' acqua bollente per fare l'infuso si conglomera in zollette, mentre il liquido diviene quasi colloso e non filtra; ottenuta la separazione della polvere per mezzo della centrifugazione, il liquido giallastro rimane torbido. L'altra è una polvere più grossolana, marrone tortora, granellosa, che si distribuisce uniformemente nell' acqua bollente, e dà un infuso che filtra rapido e limpido, di colore rosso bruno intenso. L'infuso è fatto sempre al 5 %. Queste prime esperienze sono eseguite con ipecaquana vecchia del Laboratorio:

Esp. 1a. — Topo (mus decumanus) gr. 180 di peso corporeo; femmina — Ileo.

Ringer puro = Dopo alcune contrazioni vivaci si ha un aumento di tono passeggero, seguito da un rilasciamento, che perdura anche dopo del tempo.

Tabacco, infuso 10 %, gocce 5 = Riprendono alquanto le contrazioni, che però vanno degrandando; il tono abbassa ancora.

Ipecaquana g. 5. = Diminuisce e quasi arresta le contrazioni; il tono discende sempre.

Tabacco c. s. = Ricompaiono discrete contrazioni.

Ipecaquana g. 5 = Le contrazioni sono temporaneamente soppresse.

Esp. 2a. — Topo gr. 320 di p. c.; maschio — Ileo.

Ringer puro = Le contrazioni sono di piccola ampiezza; il mesenterio non è stato esciso completamente.

Ipecaquana gocce 10 = L'ampiezza delle contrazioni per un certo tempo diminuisce, poi riprende.

Tabacco c. s. gocce 5 = L'ampiezza aumenta pochissimo.

Ipecaquana ed Emetina (sol. 2 %) ana gocce 5 = Dànno una diminuzione delle contrazioni del tutto transitoria.

Allora viene rapidamente esciso il mesenterio, e rimesso l'intestino in tensione, in modo che la penna scriva alla stessa altezza; si hanno contrazioni molto più ampie, ed oscillazioni di tono che prima non erano apprezzabili.

Ipecaquana g. 10 = Risulta lieve abbassamento delle contrazioni.

Tabacco g. 5 = Lieve aumento delle medesime.

Ipecaquana g. 40 = Si ha un forte abbassamento di tono con arresto momentaneo delle contrazioni, che riprendono assai, ma non bene, coll' infuso di tabacco.

Emetina (cloridr.) sol. 2 % gocce 5 = Si ripete lo stesso quadro prodotto dall' ipecaquana.

Più tardi l'intestino messo in liquido puro riprende a contrarsi bene, ma il tono non si risolleva.

Esp. 3a. — Topo gr. 300 di p. c.; m. — Ileo.

Ringer puro = L'intestino, appena applicato, è in istato di contrazione, come sempre succede in seguito ai maneggiamenti dell' organo per l'applicazione, ed alla, sia pur breve, esposizione all' aria.

Ipecaquana gocce 40 = Rilasciamento molto più rapido e più pronto di quanto avviene normalmente.

Ripetuta l'applicazione altre due volte si è ottenuta ancora una diminuzione di tono, ma più piccola, e, dopo la seconda, anche un abbassamento notevole delle contrazioni: notisi che in queste due applicazioni l'infuso non è stato aggiunto a gocce, ma a circa 5 cc. per volta.

Emetina c. s. g. 10 = Dà la caratteristica caduta del tono, e le contrazioni si riducono ai minimi termini.

Tanto queste, quanto, sebbene in minor grado, il tono hanno ripreso sotto l'azione di piccole tracce di ergotina ; aggiunta di nuovo una forte dose di infuso (circa 10 cc.) si osserva l'abbassamento del tono e poi dell' ampiezza delle contrazioni.



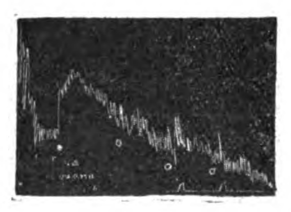
TRACC. 1 — ESP. 4ª

Esp. 4*a* — Topo gr. 280 di p. c. ; f. — Ileo. (V. tracc. 1).

Ringer puro = Contrazioni di ampiezza assai piccola.

Tabacco g. 5 = Le contrazioni hanno ripreso un aspetto che si avvicina molto a quello che è normale nella maggioranza degli altri tracciati.

Ipecaquana g. 5 = Tipica caduta del tono ; temporaneamente l'ampiezza di contrazione si è ridotta ; poi ha ripreso discretamente.



TRACC. 2 — ESP. 5ª
(Tempo in minuti primi)

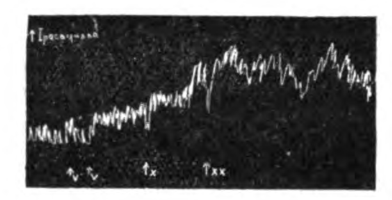
Esp. 5*a*. — Topo di gr. 140 di p. c. ; m. — Ileo, ultima porzione. (V. tracc. 2).

Ringer puro = Si può osservare bene il rilasciamento che si ha normalmente appena avvenuta l'immersione nel Ringer; rilasciamento non così brusco come quello descritto nell' esperienza n° 3 ; le contrazioni sono di poca ampiezza.

Tabacco g. 5 = Si eleva il tono per breve tempo ; poi gradatamente ridiscende.

Ipecaquana g. 40 ripetute in quattro applicazioni successive = Ad ogni applicazione il tono sospende per un poco la sua discesa, che subito dopo riprende, per continuare fino a rilasciamento completo : le contrazioni si amplificano leggermente durante la prima e la seconda applicazione, ma poi vanno diminuendo e finiscono per arrestarsi.

Questo primo gruppo di esperienze riportate sono state eseguite, come ho detto con ipecaquana vecchia di laboratorio ; dalla seguente in poi le esperienze sono fatte con ipecaquana di recente acquisto ; come sempre, mi limito a riprodurre solo una piccola parte dei protocolli sperimentali, per non aumentare inutilmente il volume del lavoro.



TRACC. 3 — ESP. 6a
I numeri romani indicano il numeri delle gocce

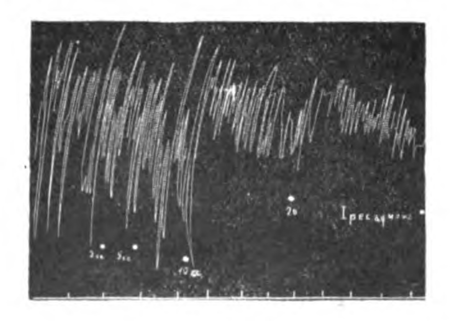
Esp. 6a. — Gattina lattante di gr. 600 di p. c. — Duodeno. (V. tracc. 3).
Ringer puro = Contrazioni non molto ampie e poco regolari.
Ipecaquana g. 5 = Fugacissimo elevamento del tono, che ritorna subito all' altezza precedente.
Ipecaquana g. 5 = Il tono si eleva alquanto, ma questa volta non tende a riabbassarsi.
Ipecaquana g. 10 = Nel momento dell' aggiunta dell' infuso si avverte un fugacissimo abbassamento di tono, a cui segue un innalzamento progressivo.
Ipecaquana g. 20 = Si ripete il medesimo quadro sopra descritto ; dopo il tono compie qualche oscillazione, ma si mantiene assai elevato.

Esp. 7a. — Gattina in tutto come sopra — Ileo.
Ringer puro = Anche su questo tratto intenstinale viene saggiato lo stesso infuso di ipecaquana al 5 %, e ad ogni applicazione è evidente l'elevamento del tono, preceduto — nell' atto dell' applicazione — da un abbassamento fugacissimo.



TRACC. 4 — ESP. 8a

Esp. 8a. — Topo gr. 180 di p. c. ; m. — Duodeno (V. tracc. 4).
Ringer puro = Contrazioni buone accompagnate da frequenti oscillazioni di tono.
Ipecaquana g. 5, 10, 20, 40, 50 successivamente = Dànno costantemente elevazione di tono, mentre le contrazioni non si modificano in maniera apprezzabile.



TRACC. 5 — ESP. 9a

Esp. 9a. — Topo di gr. 250 di p. c.; f. (gravida di 11 feti della lunghezza di 1/2 cm. circa). Duodeno. (V. Tracc. 6).

Ringer puro = Contrazioni molto ampie, ed oscillazioni di tono evidentissime. Si provano le grandi dosi di infuso, che non si comportano affatto in modo diverso da quelle precedentemente usate.
Ipecaquana cc. 2, 5 = Elevamento del tono assai transitorio.
Ipecaquana cc. 10, 20 = Il tono non ricade più, però le contrazioni sono sempre assai valide.

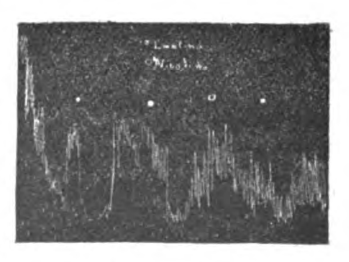
La differenza evidente di comportamento di varî tratti di intestino di fronte a quest' altra qualità di droga non può attribuirsi evidentemente che all' ipecaquana medesima, e per la sua assoluta costanza in tutte le esperienze, e per il fatto che lo stesso resultato si è avuto tanto per animali diversi, quanto per tratti differenti di intestino.

EMETINA. — Le seguenti esperienze mi sembra che si prestino bene per illustrare l'azione dell' emetina sulla muscolatura intestinale; anche queste non sono che piccola parte del materiale raccolto, e che tralascio, concordando tutti gli altri casi con questi che sto per descrivere.



TRACC 6 — ESP. 10a

Esp. 10*a*. — Topo di gr. 370 di p. c.; m. — Ileo. (V. tracc. 6).
Ringer puro = Contrazioni irregolari; si somministrano poche gocce di ergotina e di infuso di tabacco con le quali le contrazioni assumono un aspetto quasi normale (da notarsi che questo animale fu ucciso involontariamente nel prenderlo, e quindi non si poté fare la preparazione con la consueta sveltezza): rimesso nuovamente in
Ringer puro = Il tracciato presenta aspetto normale.
Emetina clorid. 2 % gocce 10 = Il tono si abbassa considerevolmente e le contrazioni diminuiscono notevolmente di ampiezza (Il tracciato 6 riporta solo questo ultimo tratto dell' esperienza).



TRACC. 7 — ESP. 11a

Esp. 11*a*. — Topo di gr. 370 di p. c.; m. — Ileo. (V. tracc. 7).
Ringer puro — Immediatamente dopo l'applicazione all' apparecchio l'intestino si rilascia, ma subito dopo ha una nuova elevazione.

Emeti ang. 5 = Brusca caduta del tono e forte diminuzione delle contrazioni ; dopo poco tanto l'uno che le altre tornano normali.
Emetina g. 5 = Si ripete in modo evidente lo stesso comportamento.
Tabacco inf. c. s. g. 5 = Aumenta considerevolmente l'ampiezza delle contrazioni : non sembra influisca gran ché sul tono.
Emetina g. 5 = Leggero abbassamento del tono, poco delle contrazioni.



TRACC. 8 — ESP. 12a

Esp. 12*a*. — Topo di gr. 120 di p. c. ; f. — Colon ascendente. (V. Tracc. 8).
Ringer puro = Questo tratto di intestino non presenta quasi nessuna contrazione : in compenso però le oscillazioni di tono vi si osservano molto bene ; esso va abbassando lievemente.
Emetina g. 5 ripetute per due volte = L'intestino si rilascia completamente.
Ipecaquana g. 50 ripetute tre volte = Il tono si risolleva presso a poco con la stessa rapidità con cui era caduto per virtù del emetina.
Emetina g. 5 = Nuova caduta del tono. Va notato che all' atto di aggiungere la sostanza si ha per l'emetina un elevamento, per l'ipecaquana un abbassamento del tono piccoli e molto fugaci.

IPECAQUANA PRIVA DI ALCALOIDI ED ALCALOIDI TOTALI DELLA MEDESIMA. — Allo scopo di semplice orientamento sono state condotte queste esperienze nell'intento di fare emergere le diversità di comportamento dell' intestino di fronte a questa droga, quando si estraggano dalla medesima tutti gli alcaloidi, che costituiscono, se non tutti, almeno i principali principî attivi di essa ; d'altro lato era parimenti interessante sapere come si modificava l' azione dell' alcaloide principale, l'emetina, per la sola presenza degli altri alcaloidi della droga; se in altri termini,spetta solo a questi il merito di modificare l' azione dell' emetina in quella della droga integra,ovvero a questo non contribuiscano altri costituenti di differente natura. A tale scopo si è trattata della polvere d'ipecaquana di recente acquisto col metodo di FLÜCKIGER, cui si è introdotta la modificazione di BECK per favorire la più completa estrazione di tutti gli alcaloidi dalla droga medesima (V. in 9). Ho quindi trattato gr. 25 di ipecaquana ripetutamente per circa otto volte con una miscela composta di cloroformio cc. 150 ed etere cc. 50 : compiuta così l'estrazione, il solvente è stato messo ad evaporare, la polvere ad essiccare a modico calore. Con la polvere si è poi fatto il consueto infuso, però nella proporzione del 50 %. Il residuo della evaporazione della miscela estraente è stato ripreso con 25 cc. di acqua distillata, acidulata con due gocce di acido tartarico ; la reazione era acida anche prima di tale aggiunta ; il colore del soluto è

giallo pallido ; non tutto il residuo dell' estrazione è solubile in acqua, in cui passano esclusivamente i tartrati degli alcaloidi in istato di discreta purezza. A titolo di controllo sono state saggiate 5 goccie di infuso della polvere trattata come si è detto con 1 goccia di reattivo di TANRET, e non han dato nessun intorbidamento apprezzabile; all'incontro, 5 gocce del soluto acquoso del residuo dell' estratto hanno dato con lo stesso reattivo copioso precipitato bianco. Da ciò ritengo che la massima parte degli alcaloidi sia passata nell' estratto, e che l'infuso sia da considerarsi praticamente come privo o quasi di alcaloidi. Passo quindi alle prove in vivo.



TRACC. 9 — ESP. 13ª

Esp. 13*a*. — Cavia di gr. 300 di p. c. ; m. — Colon disc. (V. tracc. 9).

Ringer puro = Contrazioni spontanee poco ampie, oscillazioni di tono insignificanti.

Ipec. desalcaloidizzata 50 % gocce 5 = Piccolo e fugace abbassamento di tono all'atto dell' aggiunta dell' infuso, ma subito ritorna a livello normale. Ripetuta tale somministrazione il fenomeno pure si ripete ; le contrazioni sono di poco abbassate, se mai la loro forma è sulla grafica più angolosa, cioè le contrazioni e decontrazioni sono più rapide.

Alcaloidi estratti (100 % della droga) g. 5 = Non dànno fenomeni apprezzabili.

Alc. estr. c. s. g. 10 = Dànno fugace diminuzione di tono, simile a quella ottenuta con ipeca desalcaloidizzata ; ma dopo poco si è avuto uno stabile abbassamento.

Esp. 14*a*. — Cavia della prec. esp. ; — Colon discendente.

Ringer puro = Condizioni di contrazione simili a quelle della precedente esperienza.

Ipeca desalc. g. 20 = Si ripete il quadro sopra descritto, solo seguono alla prima altre oscillazioni di tono sempre più piccole.

Alcaloidi estr. g. 20 = Dànno un quadro molto simile a quello precedente provocato dall' ipecaquana priva di questi alcaloidi ; solo si nota una tendenza maggiore al rilasciamento ; le contrazioni, sempre piccole, sono però nette.

Emetina sol. 2% c. s. g. 5 = Provocano un brusco rilasciamento, con cessazione quasi completa di ogni attività di contrazione ; solo dopo un certo tempo riprendono piccole oscillazioni di tono, che però non si risolleva più.

Esp. 15 *a*. — Cavia di gr. 320 di p. c. ; m. — Ileo.

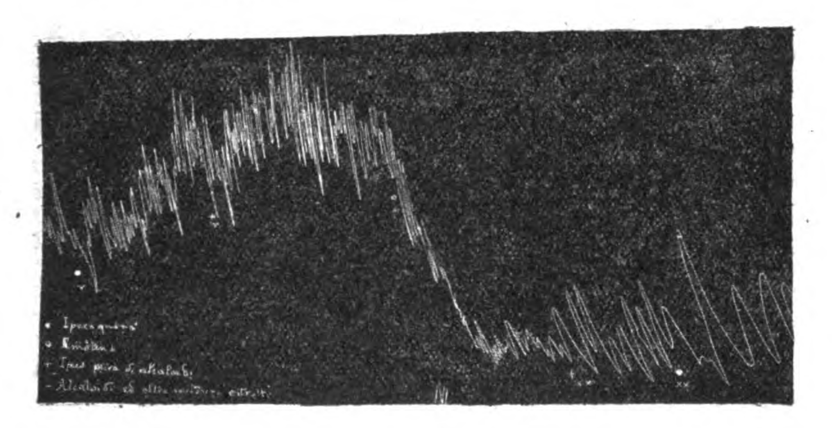
Ringer puro = Contrazioni di mediocre ampiezza.

Ipecaquana inf. 10 % (integra) g. 5 e 10 successivamente = Fugace abbassamento immediatamente seguito da altrettanto fugace innalzamento del tono.

Ipec. desalc. g. 10 = Ripetono il quadro precedente, ma in modo molto meno spiccato ; ad una seconda applicazione di 10 gocce però, l'evidenza del quadro è molto più spiccata, che non fosse quella data dall' ipecaquana non trattata ; intanto il tono aumenta gradatamente.

Alcaloidi estr. g. 20 = Rilasciamento transitorio, a cui segue la prosecuzione dell'aumento del tono : le contrazioni accrescono la loro ampiezza, ma subiscono al tempo stesso una evidente rarefazione.

Emetina c. s. g. 10 = Consueto brusco rilasciamento e diminuzione nell' ampiezza delle contrazioni. Applicate poi 20 gocce di infuso di ipecaquana priva di alcaloidi e successivamente 40 gocce della soluzione degli alcaloidi totali estratti dalla medesima non si è ottenuto altro effetto che un fugace rilasciamento all' atto dell' applicazione.



TRACC. 10 — ESP. 16a

Esp. 16*a*. — Cavia di gr. 350 di p. c. ; m. — Ileo. (V. tracc. 10).

Ringer puro = Contrazioni assai valide.

Ipecaquana integra g. 5 = Fugace rilasciamento ; subito dopo il tono gradatamente si eleva.

Ipec. desalc. g. 5 = Fugace abbassamento, dopo del quale il tono prosegue la sua ascesa : contrazioni ampie e frequenti.

Alcaloidi estr. g. 10 = Non modificano apprezzabilmente il tracciato.

Emetina g. 10 = Brusco rilasciamento completo ; diminuzione di ampiezza delle contrazioni.

Ipec. desalc. g. 20 = Aumenta l'ampiezza e la rarefazione delle contrazioni ; il tono non si risolleva.

Ipecaquana integra g. 20 = Solito fugace rilasciamento e successiva contrazione più ampia.

Senza passare a considerazioni generali, che riservo alla fine del lavoro, mi interessa far rilevare questi utili confronti : le soluzioni di cloridrato di emetina 2 % e di tutti gli alcaloidi estratti dalla droga e disciolti in acqua con una concentrazione del 100 % rispetto alla droga, devono approssimativamente contenere la stessa percentuale di emetina base, rappresentando essa appunto l' 1-2 % della droga. Per quel che riguarda gli infusi di cui sopra, si ricordi che quello di ipecaquana privata di alcaloidi è fatto al 50 %; quello di ipecaquana integra in genere è al 5 %, solo in queste esperienze era al 10 % ; ne segue, che ogni goccia della ipecaquana trattata corrisponde a 5 -10 gocce di droga integra : ciò nonostante è evidente che la droga privata degli alcaloidi ha perduto ogni caratteristica biologica. mentre la soluzione di tutti

gli alcaloidi se non ha portato con sé le proprietà fisiologiche dell'ipecaquana integra, non ha neppure in modo evidente le proprietà dell' emetina.

* * *

Per illustrare alquanto il meccanismo di azione della droga che abbiamo fra mano, e dei suoi principî attivi, abbiamo ritenuto conveniente vedere se, e come, si modificava il suo quadro di azione, mettendo il tratto intestinale su cui si svolge l'esperienza, sotto l'azione di altri farmaci, il cui modo di agire ci è almeno in buona parte noto. Abbiamo così saggiato l' Atropina, la Pilocarpina, l'Eserina, ed alcuni preparati di principî attivi di Capsule surrenali. Ecco qualcuna delle esperienze relative.

PROVE ESEGUITE IN PRESENZA DI ATROPINA. — Premettiamo che il nostro concetto sull' azione dell' atropina sopra l'intestino in genere, e su di un tratto di intestino isolato in ispecie, è che essa si limiti a paralizzare lo pneumogastrico eccitomotore intestinale, e che tale paralisi lo interessi specialmente nelle sue terminazioni intramuscolari. Dosi piccolissime però paralizzano transitoriamente lo splancnico (eccitazione), mentre dosi forti influiscono anche direttamente sulla fibra muscolare.



TRACC. 11 — ESP. 17a

Esp. 17*a*. — Cavia di gr. 240 di p. c. ; m. — Ileo (V. tracc. 11).
Ringer puro = Piccole contrazioni : il tono diminuisce considerevolmente.
Ipecaquana g. 10 = Evidente contrazione, ma non molto ampia.
Ipecaquana g. 20 = Contrazione amplissima.
Atropina solfato 1 °/₀₀ g. 10 (applicate durante il rilasciamento della precedente contrazione) = Favoriscono il rilasciamento completo, seguito però da altre contrazioni discrete ; poi il tono riprende.
Atropina g. 10 = Dànno luogo ad un brusco elevarsi del tono.
Ipecaquana g. 20 = Risvegliano una contrazione discreta : il tono prosegue poi a mantenersi assai alto, e vi sono contrazioni evidenti.

Esp. 18*a*. — Cavia usata nella esp. 17. — Colon ascend.
Ringer puro = Piccole contrazioni ; l'intestino si rilascia sotto la trazione del peso.
Atropina g. 2, e 3 successivamente = Inducono diminuzione di ampiezza delle contrazioni : anche il tono abbassa.

Atropina g. 5 = Fugace rilasciamento seguito da contrazione, dopo la quale il tono riprende.

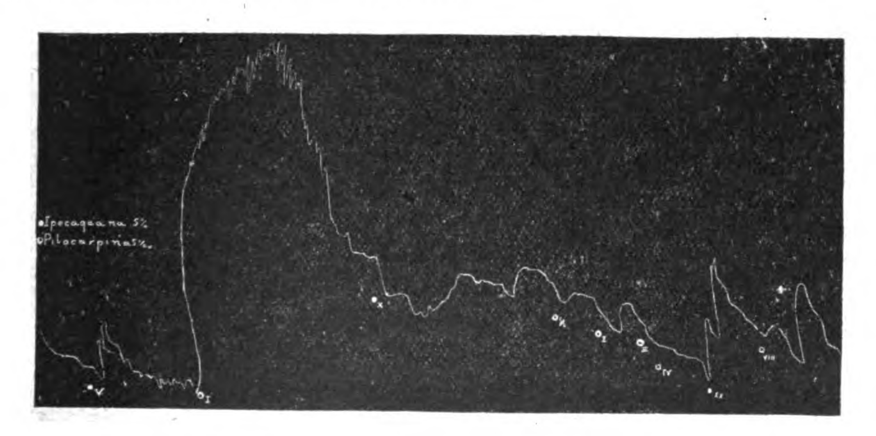
Emetina g. 5 = Contrazione discreta seguita da rilasciamento considerevole, le contrazioni si riducono ad oscillazioni piccolissime : successivamente il tono riprende.

Atropina g. 20 = Leggerissimo e fugace rilasciamento : poi il tono riprende la ascesa già iniziata.

Emetina g. 3 = Il tono immediatamente abbassa ; le contrazioni non si percepiscono quasi più ; dopo riprendono alquanto.

Risulta dunque che l'atropina non modifica apprezzabilmente il quadro emetinico ed ipecaquanico ; invece l'ipecaquana esalterebbe la prima fase di azione atropinica cioè la paralisi dello splancnico, quindi per l'aggiunta di atropina si vede più facilmente che l'intestino si contrae, anziché rilasciarsi.

PROVE ESEGUITE IN PRESENZA DI PILOCARPINA. — E' noto che questa sostanza eccita l' intestino, ed in genere la muscolatura dipendente dal sistema autonomo a contrarsi assai vivacemente ; si ritiene pure dai più che tale eccitazione, sebbene possa essere in parte anche direttamente muscolare, avvenga principalmente per azione nervosa di eccitazione dello pneumogastrico.



TRACC. 12 — ESP. 19ª

Esp. 19*a*. — Cavia di gr. 280 di p. c. ; m. — Colon ascendente (V. tracc. 12). Avvertiamo che in questa, come nelle seguenti esperienze, abbiamo usato di tratti di intestino più brevi del solito, altrimenti la violenta contrazione pilocarpinica sarebbe uscita dalla grafica.

Ringer puro = Scarse contrazioni ; il tono va diminuendo.

Ipecaquana g. 5 = Consueta contrazione ; dopo il rilasciamento il tono rimane stazionario.

Pilocarpina (cloridr.) 1 °/₀₀ g. 1 = Contrazione pronta e violentissima ; l'intestino rimane contratturato per circa due minuti, durante i quali si notano scarsi movimenti ; di poi si rilascia assai rapidamente.

Ipecaquana g. 10 applicate durante il rilasciamento = Questo si arresta momentaneamente, e tende a contrarsi di nuovo, ma sono piuttosto oscillazioni che altro ; segue poi qualche contrazione assai rapida con rilasciamento stentato : analoghe contrazioni destano successivamente

Pilocarpina g. 1/2, 1 e 2 = Evidentemente l'organo è esaurito dalla prima applicazione, e non può rispondere con eguale energia.

Pilocarpina g. 4 = Passano del tutto inavvertite ; invece

Ipecaquana g. 20 = Dànno una bella contrazione ; anche in essa si nota il rilasciamento stentato.

Pilocarpina g. 8 = Piccola contrazione, seguita da una alquanto più ampia.

Esp. 20*a*. — Cavia di gr. 330 di p. c. ; Colon ascend. —

Ringer puro = Qualche contrazione di tipo caratteristico del colon, assai ampie : il tono va rilasciandosi.

Emetina g. 3 = Contrazione iniziale consueta, poi il tono diminuisce, e le contrazioni si fanno meno ampie.

Pilocarpina g. 1 = Energica contrazione, cui segue un rilasciamento molto stentato, durante il quale si applicano

Emetina g. 5 = La caduta del tono si fa più rapida e completa, le contrazioni cessano del tutto : solo dopo molti minuti riprendono fino a tornare quasi normali.

Da queste e da altre esperienze con esse concordi, e che per questo non sto a riportare, risulta dunque che né l'ipecaquana né l'emetina impediscono l'azione della pilocarpina, né questa ostacola l'azione loro ; inoltre, mentre subito dopo un forte stimolo dato dalla pilocarpina l' intestino rimane ineccitabile o quasi all' applicazione di dosi anche otto volte maggiori di quella usata in principio, è pronto a rispondere in modo quasi normale agli stimoli provocati dalla nostra droga o dal suo principio attivo. Per queste considerazioni ritengo dunque che l' ipeca non stimola il vago, ma elementi successivi della catena, come le fibre muscolari, ovvero paralizza il simpatico.

PROVE ESEGUITE IN PRESENZA DI ESERINA. — L'azione di questo alcaloide si avvicina molto a quella propria della pilocarpina; solo nel suo meccanismo di azione entra probabilmente anche una azione diretta sulla muscolatura, od almeno crediamo doversi ritenere, che mentre per la pilocarpina si può parlare di una prevalenza di azione sui nervi, qui si può pensare ad una prevalenza di azione sulle fibre muscolari, pur non potendosi in modo categorico accettare nessuna limitazione assoluta in simile campo. Ecco alcune esperienze assai dimostrative in proposito.

Esp. 21*a*. — Cavia di gr. 230 di p. c. ; m. — Colon discend.

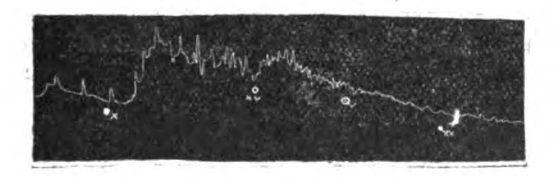
Ringer puro = Subito dopo l'applicazione l'intestino rimane in riposo quasi assoluto ; non si notano che piccole oscillazioni, nessuna vera contrazione.

Ipecaquana g. 10 = Nessuna modificazione apprezzabile.

Eserina soluz. 5 o/oo g. 5 = L'intestino si contrae fortemente ; compaiono intanto oscillazioni discrete : dopo parecchi secondi che l'organo è contratto, lentamente si rilascia ; le contrazioni si mantengono valide.

Emetina g. 5 = Subito dopo l'applicazione presenta una contrazione assai valida, dopo della quale il rilasciamento si fa completo, e le contrazioni si riducono notevolmente di ampiezza.
Ipecaquana g. 40 = Inducono un lieve accrescersi dell' ampiezza di contrazione.

Esp. 22*a*. — Cavia c. s. — Ileo.
Ringer puro = Contrazioni piccolissime ; il tono rimane quasi stazionario.
Emetina g. 5 = Solo il tono subisce in principio un lento aumento, seguito da una diminuzione altrettanto lenta ; le contrazioni rimangono piccolissime.
Eserina g. 4 = Il tono subisce dapprima un innazalmento non molto elevato, ma pronto ; dipoi prosegue in una ascesa assai prolungata.
Ipecaquana g. 20 = Accentuano questa ascesa : le contrazioni sono rimaste piccole come in principio.
Emetina g. 10 = Fanno immediatamente cadere il tono fino all' altezza primitiva, riducendo le contrazioni ad una ampiezza quasi impercettibile.
Eserina g. 10 = Passano del tutto inavvertite.

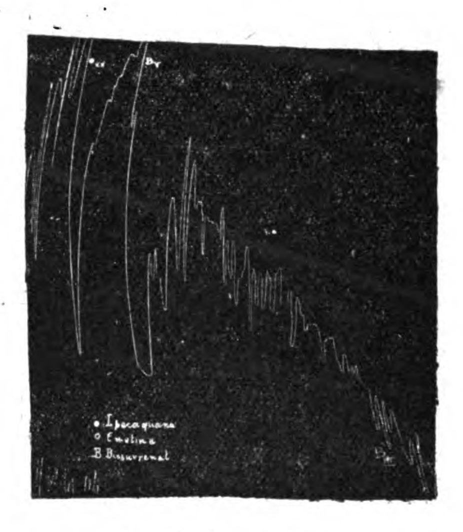


TRACC. 13 — ESP. 23ª

Esp. 23*a* = Cavia c. s. — Digiuno. (V. tracc. 13).
Ringer puro = Contrazioni valide ma alquanto rare ; il tono lentamente degrada.
Eserina g. 10 = Pronta elevazione del tono; giunto al suo acme comincia il rilasciamento assai lento; intanto le contrazioni si sono fatte più valide e più frequenti.
Ipecaquana g. 15 = Immediatamente il tono si risolleva, l'ampiezza delle contrazioni diminuisce, mentre la frequenza va crescendo : poi il tono seguita a diminuire.
Emetina g. 5 = Lasciano che il tono cada ancora, però le contrazioni diminuiscono la loro ampiezza.
Eserina g. 20 = Non sono avvertite.

Risulta dal sopra detto che la ampia contrazione seguente l'aggiunta di eserina al bagno di RINGER non ha luogo, od almeno è ridotta a proporzioni di gran lunga inferiori al normale quando l'intestino ha subito l'azione emetinica : ciò invece non è mai accaduto con le prove eseguite con pilocarpina. Non si poteva mettere in evidenza questo stesso fatto per l'infuso di ipecaquana, per la semplice ragione che tanto essa quanto la pilocarpina e l'eserina hanno azione sinergica almeno quanto agli effetti.

PROVE ESEGUITE IN PRESENZA DI PREPARATI OPOTERAPICI SURRENALI. — E' superfluo che io ricordi, anche di sfuggita, che l'adrenalina eccita le terminazioni del simpatico, e perciò arresta i movimenti intestinali, essendo essi inibiti dal simpatico. Mi sono servito per queste esperienze di campioni della Paraganglina Vassale (Istit. Sieroter. Milanese) e del Biosurrenal (Istit. Opoter. Naz. Pisa) gentilmente inviatimi.



TRACC. 14 — ESP. 24ª

Esp. 24*a*. — Cavia di gr. 250 di p. c. ; f. — Colon discend. (V. tracc. 14).
Ringer puro = Contrazioni ampie ed energiche ; il tono va sempre aumentando.
Ipecaquana g. 20 = Forte decontrazione seguita immediatamente da ampia e rapida contrazione, all' apice della quale viene applicato
Biosurrenal g. 5 = Immediato rilasciamento, dopo del quale tenta risollevarsi ; ma dopo poche contrazioni il rilasciamento è manifesto.
Emetina g. 5 = Il rilasciamento si manifesta ancor meglio e l'ampiezza delle contrazioni diminuisce.
Biosurrenal g. 3 = L'intestino si rilascia completamente e non presenta più contrazioni di sorta per molti minuti.

Esp. 25*a*. — Cavia dell' esp. 24a — Ileo.
Ringer puro = Scarse contrazioni ; il tono è stazionario.
Ipecaquana g. 10 = Contrazione discreta, seguita da prolungato rilasciamento
Biosurrenal g. 5 = In un primo momento risveglia una energicaco ntrazione, seguita da modico rilasciamento, durante il quale si notano piccole contrazioni come nel tracciato normale di questo tratto intestinale.
Emetina g. 5 = Il rilasciamento si fa completo e le piccole contrazioni si arrestano.
Biosurrenal g. 8 = Non modificano lo stato di paralisi ; solo assai più tardi ricompaiono contrazioni di modica ampiezza, caratterizzate da una maggior lentezza tanto nell' ascesa come nella discesa.
Paraganglina g. 5 = La penna si abbassa e traccia una linea diritta orizzontale, ciò che mostra che il simpatico è ancora bene eccitabile.

Esp. 26*a*. — Cavia di gr. 260 di p. c. ; f. — Ileo.
Ringer puro = Piccole contrazioni ; il tono va diminuendo.
Paraganglina g. 5 = Arresto temporaneo delle contrazioni il tono rimane stazionario.
Biosurrenal g. 5 = Leggera contrazione ; prosegue poi lo stato precedente
Emetina g. 6 = Rilasciamento brusco, immediato e completo.
Biosurrenal g. 6 ripetute per due volte = Non modificano il tracciato.
Ipecaquana g. 5 = Dà immediatamente una ampia contrazione, cui ne seguono altre meno ampie ; ma che vanno sempre crescendo insieme al salire del tono : dopo

un certo tempo le contrazioni si fanno di nuovo impercettibili, ed il tono si rilascia un' altra volta.

Biosurrenal g. 12 = Dà una piccola contrazione, seguita da altre sempre più basse; il tono resta immutato.

Da queste ultime esperienze si può dunque dedurre, che l'azione ipecaquanica ed emetinica si può liberamente svolgere, anche quando l'organo è sotto l'azione dei prodotti delle capsule surrenali: l'inversa ha bisogno di una riserva, che cioè quei composti di surrenali, che all' atto della somministrazione sogliono dare una leggera contrazione, esagerano tale fenomeno quando l' intestino trovasi sotto l'azione eccitante della ipecaquana.

Riassunto delle osservazioni, e considerazioni relative:

1° — L'ipecaquana applicata direttamente sull' intestino stimola questo a contrarsi: all' inizio dell' applicazione però, ciò che forse corrisponde alla somministrazione in vivo di piccole dosi, si ha una fase di rilasciamento.

2° — L'emetina esercita pure una considerevole attività sui movimenti intestinali, inducendo paresi o paralisi a seconda delle dosi usate: le piccole però ci permettono di constatare all' inizio una fugace, ma non costante fase di eccitazione. Il comportamento del principio attivo è dunque tutto l'opposto di quello che ci presenta la droga.

3° — L'ipecaquana polverizzata, col tempo, va soggetta ad alterazioni, in seguito alle quali acquista proprietà molto simili a quelle del suo alcaloide principale: ne deduciamo quindi, in semplice forma di ipotesi, che si alterino, e perciò perdano la loro attività, quelle sostanze che nella droga recente modificano fino ad invertire l' azione dell' emetina, così che nella droga stagionata solo questa è capace di svolgere la propria azione immodificata: da ciò è pure lecito dedurre che l'emetina è abbastanza stabile.

4° — L' ipecaquana privata degli alcaloidi non è del tutto inattiva sul tono muscolare, su cui induce una sensibile diminuzione, non tuttavia stabile. Le contrazioni non subiscono modificazioni apprezzabili.

5° — La miscela degli alcaloidi estratti dalla droga presentano nelle linee generali i caratteri e le proprietà dell' emetina, ma ridotti in proporzioni minime: il che porta ad ammettere che ne esistono alcuni ad azione antagonista.

6° — Esiste nella droga un principio eccitante per la muscolatura intestinale, che dopo il procedimento da noi usato per estrarre la miscela degli alcaloidi non si ritrova più, né nella miscela, né nell'estratto. Tre ipotesi mi sembrano fra le più logiche a spiegare tale constatazione: o questo principio viene estratto col solvente usato, ma non è poi solubile in acqua, e non passa quindi nella soluzione

sperimentata; o si tratta di una sostanza che col nostro procedimento si altera, od infine è una sostanza che per agire necessita di un attivatore, dal quale viene separata in seguito al processo di estrazione.

7° — E' da escludersi che l'ipecaquana ecciti l' intestino agendo sul vago, poiché svolge la sua attività anche dopo atropinizzazione.

8° — E' da escludersi poi che tanto l'emetina come l'ipeca agiscano sullo splancnico, l'una eccitando, l'altra paralizzando, inquantoché durante la paralisi emetinica, l'eccitazione pilocarpinica è tuttavia avvertita ; e l'eccitazione ipecaquanica avviene anche quando l'intestino non risponde più alla pilocarpina, perché esaurito da una stimolazione eccessiva con la medesima.

9° — E' verosimile che l'emetina agisca direttamente sulla fibra muscolare, in quanto che dopo di essa, l'eserina non è capace di svolgere la propria azione in modo evidente.

10° — Quando il simpatico — inibitore intestinale — trovasi sotto l'eccitazione adrenalinica, l'ipecaquana è sempre capace di svolgere la propria azione eccitante intestinale ; dunque la sua azione si esplica al di là delle terminazioni del simpatico, cioè sulla fibra muscolare, ciò che conferma le precedenti osservazioni.

CONCLUSIONI.

1° — L'ipecaquana eccita l' intestino a contrarsi, mentre il suo principio attivo ha una azione diametralmente opposta.

2° — Quando l'ipeca col tempo si altera, allora risalta meglio, anzi direi esclusivamente, l'azione dell' emetina.

3° — Separando gli alcaloidi dalla droga col metodo Flückiger-Beck, questa perde le sue proprietà eccitanti ; la miscela degli alcaloidi presenta i caratteri del principale di essi, ma di gran lunga ridotti.

4° — Tanto l' ipeca quanto l' emetina svolgono la propria azione prevalentemente, se non esclusivamente, sulle fibre muscolari.

BIBLIOGRAFIA.

1. — NICCOLINI — *Arch. intern. de Pharm. et de Thér.* — XXV, 453 (1920).
2. — GIACOSA — Materia Medica — *Bocca-Torino* (1893).
3. — HUSEMANN — Materia Medica — *Vallardi-Milano.*
4. — CANTANI — Farmacologia clinica. Vol. IV — *Vallardi Milano.*
5. — SOULIER — Terapeutica e Farmacologia — *Vallardi-Milano.*
6. — STOCKVIS, — Pharmacothérapie — *Doin-Paris* (1896).
7. — HUERRE — *Presse médicale* — 1917, n° 60.
8. — WEILL — *Presse médicale* — 1916, n° 1.
9. — GUARESCHI — Commentario alla faımacopea italiana. Vol. II p. Ia, pag. 330 — *Vallardi-Milano.*

INSTITUT DE PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE LISBONNE.
Directeur : Prof. SILVIO REBELLO.

Le contrôle de la « réaction actuelle » des tissus animaux par les fils-indicateurs. Une méthode pour le diagnostic de la mort

PAR

SILVIO REBELLO.

L'étude de la véritable réaction, de la « réaction actuelle », des milieux organiques présente une importance toujours croissante pour les biologistes. Les méthodes modernes pour cette détermination (piles de concentration d'hydrogène et la méthode des indicateurs telle qu'elle a été établie par SÖRENSEN pour l'étude des actions enzymatiques) permettent une facile et exacte solution numérique de ce problème. Cependant, si nous connaissons les valeurs de [H•], c'est-à-dire la concentration des ions hydrogène(1), de la plupart des liquides de l'organisme animal et leur constance dans le sang des animaux supérieurs pendant la vie, nos connaissances sont encore fort limitées au sujet de la réaction des milieux intra-cellulaires. Des produits cataboliques, tels que l'acide carbonique, l'acide lactique, etc., existent certainement dans la cellule vivante en plus grande concentration que dans le sang. Pendant la vie, le milieu intra-cellulaire devra être moins alcalin que le sang ; probablement, il se trouvera même compris dans les limites d'une légère acidité.

Les recherches quantitatives par la méthode électrométrique sur des extraits de tissus (MICHAELIS) ont fourni des valeurs d'acidité exagérées, vu la très rapide accumulation d'acides après la mort. La destruction des ferments des tissus par leur passage immédiat

(1) La concentration des ions hydrogène, [H•], exprime le nombre d'atomes-grammes de H par litre et constitue ainsi le facteur de normalité d'une solution par rapport à cette espèce ionique. C'est la seule façon d'exprimer numériquement la « force » acide ou basique d'une solution.

dans l'eau bouillante, privant ceux-ci de l'acide carbonique normalement contenu, rendait ces valeurs excessives par alcalinité. Et, même dans ces dernières conditions, on a pu démontrer une légère acidité des sucs tessiculaires de certains organes. MICHAELIS, s'exprimant en « exposant des ions hydrogène » ($p_H = -\log [H^\cdot]$) selon la notation, aujourd'hui universelle, proposée par SÖRENSEN, a trouvé des valeurs de p_H depuis 6,02 à 7,03 pour des organes de divers animaux.

Cet auteur conclût de ses déterminations que, dans le foie, le cœur et les muscles de la Souris, du Cobaye, du Chat et du Chien, pendant la vie, doit être $[H^\cdot] = 1$ à $1,5 \times 10\ H^{-7}$, c'est-à-dire $p_H = 7$ à 6,8. D'autre part, on sait (HASSELBALCH, MICHAELIS, etc.) que le sang veineux a $[H^{\cdot 7}] = 0,49 \times 10\ H^{-7}$ ($p_H = 7,31$) et le sang artériel $[H^\cdot] = 0,35 \times 10\ H^{-7}$ ($p_H = 7,45$).

MATHEWS affirme l'alcalinité des cellules animales au rouge-neutre. Ce fait ne peut être admis, car il signifierait $p_H > 7,5$, c'est-à-dire $[H^\cdot] < 0,316 \times 10\ H^{-7}$. Cet auteur a même très bien résumé les inconvénients de l'injection d'indicateurs pour juger de la réaction cellulaire. Ces substances peuvent, par leur toxicité, modifier les conditions physiologiques de l'organisme et altérer ainsi la réaction chimique normale du protoplasma. Seuls les colorants susceptibles de se combiner avec quelque élément histologique sont capables de se fixer sur les cellules. Les cellules, par leurs propriétés réductrices, peuvent transformer ces substances en leuco-dérivés ; par ce fait, l'observateur sera induit facilement en erreur sur la zone de distribution du réactif et sur la réaction démontrée. Et, en présence de colloïdes de signe électrique opposé, le colorant peut former des sels insolubles ou être fixé par adsorption (par exemple, rouge-neutre et protéines); adsorbé ou à l'état de sel insoluble, l'indicateur peut présenter une coloration saline invariable sans qu'il puisse virer vers celle qu'il présenterait sous la forme d'acide ou de base libre.

Pour le monde animal, CROZIER a démontré que le pigment intracellulaire d'un Mollusque nudibranche, *Chromodoris zebra*, est un véritable indicateur ayant son point de virage chromatique entre $p_H = 5,6$ et 5,9. Mettant ce fait à profit, il a étudié la pénétration de certains acides dans la cellule vivante de ce Mollusque. Il a étudié également ce problème sur le pigment de *Ascidia atra* qui vire du rouge au vert à $p_H = 7,5$, et de *Ptychodera sp.* et *Eupolymnia aurantiaca* dont les virages se font vers $p_H = 8$ et 10.

Pour les tissus végétaux, PFEFFER avait déjà soutenu que les modifications de coloration de la fleur étaient dûes à des changements de réaction. HAAS, par l'étude des matières colorantes de certaines fleurs, et spécialement des pigments de l'anthocyanine, a démontré qu'elles se comportaient en véritables indicateurs et a déterminé, pour chacune, son point de virage. Dans le monde végétal, il est facile, du reste, de rencontrer des réactions extrêmes : dans le

suc par expression de *Oxalis cernua*, nous avons déterminé, par la méthode électrométrique, $p_H=1,51$, correspondant à une solution 8/10 n d'acide oxalique.

L'étude des variations de réaction du protoplasma animal peut être vraiment utile pour la solution de problèmes de haute importance. Malgré l'existence du mécanisme régulateur qui, surtout par l'équilibre $CO_2 \rightleftharpoons$ Bicarbonates, maintient dans le sang, à travers la vie, une concentration invariable d'ions d'hydrogène, le milieu cellulaire doit présenter des variations soit à l'état normal soit à l'état pathologique. Ces changements peuvent être prévus comme certains sans qu'on ait pu, jusqu'à présent, démontrer leur existence.

La méthode dont nous nous sommes servi pour ces recherches est extrêmement simple et passible de grande quantité d'applications. Cette méthode est fondée sur l'introduction en guise de séton, à travers la peau, les muscles, les organes internes, de fils de soie colorés par certains indicateurs à virage parfaitement défini dans ses rapports avec les valeurs de la concentration en ions hydrogène. De l'emploi simultané de plusieurs fils teints par différents indicateurs, on peut arriver à une détermination de la valeur de p_H dans les tissus et, surtout, apprécier les variations de celle-ci.

Le choix des indicateurs doit obéir à des conditions bien déterminées. La première de ces conditions sera que le changement de couleur soit obtenu dans les limites de variation de $[H^\cdot]$, c'est-à-dire au dedans des limites probables de la variation des tissus. Cette zone, comprise entre $p_H=7,45$ (sang artériel) et $p_H=6$ (muscle frais post-mortem), est couverte par les indicateurs de la zone neutre qui sont aujourd'hui déjà assez nombreux. Les indicateurs choisis doivent présenter un virage chromatique net et, autant que possible, ne pas virer vers le rouge. Le changement de coloration doit être rapide (la cyanine et l'hématéine virent lentement), et dépendre uniquement des variations de $[H^\cdot]$ sans être nullement sensibles à la présence d'autres ions (l'hématoxyline, par exemple, en présence des ions *Fe* ou *Cu*).

Nous avons essayé de nombreux indicateurs ; mais, les conditions exigées pour leur application en ont beaucoup réduit le nombre. Par contre, nous n'avons pas étudié les mélanges d'indicateurs. Ces mélanges peuvent assurer des virages plus nets pour de très larges différences d'ions d'hydrogène. Mais, il n'y avait aucun avantage à retirer de leur emploi dans les valeurs limitées et connues de $[H^\cdot]$ sur lesquelles devaient porter nos recherches. Par cette méthode, nous avons commencé à étudier les variations de concentration d'ions hydrogène dans les tissus animaux sous l'action progressive de médicaments dépresseurs (anesthésiques, bromures, morphine, scopolamine, etc.). Il est connu que les centres régulateurs de la réaction « actuelle » du sang sont déprimés par les paralysants du système

nerveux central. Il nous a paru digne d'intérêt d'étudier le contre-coup de cette acidose sur des tissus animaux normalement déjà moins alcalins que le sang même. Cependant, la coloration hématique, presque inévitable, des fils indicateurs, malgré nos efforts (imbibition des fils en gélatine insolubilisée, en collodion riciné, etc.) a troublé fortement ces recherches. Par contre, nous avons pu observer que, aussitôt après la mort de l'animal, l'acidité précoce et grandissante des tissus était très facilement démontrable par cette méthode. Comme signe d'arrêt du mécanisme régulateur de [H·] (c'est-à-dire, comme signe de mort), le témoignage des fils indicateurs passés à travers la peau était d'indiscutable évidence. La neutralisation des acides cataboliques par $NaHCO_3$, par Na_2HPO_4 ou, même en certains cas, par NH_4, l'oxydation de l'acide lactique par O_2, l'élimination de CO_2 par la voie respiratoire et de NaH_2PO_4 par la voie rénale, confèrent au sang une réaction invariable. Celle-ci ne peut-être troublée définitivement qu'au moment de la mort ou, passagèrement, par dépression nerveuse centrale ; mais, alors, sans que la valeur numérique de la concentration en ions hydrogène du sang puisse dépasser certaines limites connues et déterminées. A l'arrêt circulatoire correspond une accumulation immédiate de substances acides dans les liquides interstitiels et il est bien aisé de faire ressortir cette accumulation par la simple méthode que nous proposons.

Les indicateurs que nous avons cru utilisables pour ce but spécial, sont ceux dont la variation chromatique se fait entre $p_H=6$ et 8 et d'autres encore compris dans de plus larges limites. Le colorant, fixé au fil par adsorption ou par réaction chimique, peut, dans ces conditions, présenter des variations dans ses limites de sensibilité que seule l'expérimentation pourra faire connaître. Le simple fait de virer en rouge ne nous a pas fait exclure à première vue un indicateur, quand d'autres raisons auraient pu conseiller son emploi. Ainsi, le tournesol, le rouge-neutre, l'acide rosolique, ont été essayés par nous. Dans le tableau suivant nous réunissons les indicateurs que nous avons jugé dignes d'intérêt et nous signalons les limites de l'exposant des ions hydrogène dans lesquelles ils peuvent être utilisés, quand ils sont en solution.

	p_H
Rouge de Méthyle	4,2 — 6,3
Lacmoïde	4,4 — 6,2
Azolithmine	4,5 — 8,3
Cochenille	4,8 — 6,2
p-Nitrophénol	5,0 — 7,0
Tournesol	5,0 — 8,0
Pourpre de Bromocrésol (Dibromocrésolsulphonephtaléine)	5,2 — 6,8
Alizarine	5,5 — 6,8

Bleu de Bromothymol (Dibromothymolsulphonephtaléine)	6,0 — 7,6
Rouge-neutre	6,5 — 8,0
Rouge de Phénol (Phénolsulphonephtaléine)	6,8 — 8,4
Acide rosolique.	6,9 — 8,4
Cyanine	7,0 — 8,0
Rouge de Crésol (Orthocrésolsulphonephtaléine)	7,2 — 8,8
α-Naphtolphtaléine	7,3 — 8,7
Tropéoline OOO nº 1	7,6 — 8,3

Nous avons réalisé de nombreux essais *in vitro* avec des fils colorés par ces réactifs. Nous avons étudié des sérums de diverses espèces animales ; mais, plus particulièrement, nous avons étudié des mélanges de solutions 1/15 mol. de phosphate secondaire et de phosphate primaire de soude, lesquelles, préparées d'après la méthode de SÖRENSEN, nous fournissent toutes les valeurs de p_H depuis 4,5 à 8, 30 par des transitions insensibles. De cette façon, nous avons pu juger les différences entre les valeurs chromatiques des indicateurs en solution et celles qu'ils présentent alors qu'ils sont fixés sur des fils de soie. Ces essais préliminaires ont été suivis par d'autres, réalisés sur certains animaux (Souris, Cobaye, Lapin et Chien) sacrifiés de différentes manières. Par ces essais et par les recherches définitives faites sur des cadavres humains et sur des membres immédiatement aprés l'amputation, nous sommes arrivé à la conclusion que, de tous les indicateurs, le Bleu de Bromothymol est de beaucoup le préférable.

Pour la préparation des fils indicateurs, nous avons choisi du fil à suture, en soie, dégraissé par l'éther. La solution de Bleu de Bromothymol (produit de Hynson, Westcott & Dunning, acheté à la maison Arthur H. Thomas Cº., Philadelphia, U. S. A.) est préparée par la dissolution de 0, 1 gr. du colorant dans 15 cc. d'alcool à 80º. On obtient ainsi une solution jaune-rouge qui teint les fils en jaune. Pour la préparation du sel sodique de l'indicateur, on dissout 0,1 gr. de celui-ci dans 1,6 cc. de NaOH n/10 et on complète avec l'alcool suffisant pour 15 cc. Cette solution d'un beau bleu sert à teindre les fils qui, par leur virage en jaune, témoigneront la plus grande concentration en ions hydrogène des tissus morts. Si ce fil devient verdâtre en vieillissant, il suffit de le mouiller rapidement dans une solution alcoolique très faible de NaOH, pour qu'il reprenne la coloration bleue nette, plus convenable. Les fils se conservent très bien à l'abri de la lumière. En 1922, nous avons pu employer des fils préparés en 1920, tenus à l'air dans l'obscurité.

La technique pour l'application de ces fils est très simple. Au moyen d'une grosse aiguille d'emballeur, on fait passer un bout de fil à travers un pli de la peau, en guise de séton, en plein tissu

cellulaire. On choisira de préférence une région déclive et d'accès facile, telle que la face antéro-externe de la jambe. En pratique, l'usage de deux fils est nécessaire : l'un coloré en jaune par la solution alcoolique de Bleu de Bromothymol (fil témoin), l'autre coloré en bleu par le sel sodique de l'indicateur (fil contrôleur). Au bout d'une heure, on tire les fils par un bout, tenant l'autre extrémité pour pouvoir les réintroduire si besoin en est. Le changement en jaune du fil bleu et la conservation de la couleur primitive du fil jaune dans la partie plongée dans les tissus, constituent un signe de mort indubitable. On peut observer habituellement une étroite zone verdâtre presqu'au contact de la peau, sur la partie libre du fil jaune ; nous l'interprétons comme un phénomène de « capillarisation » semblable à ce que l'on voit quand on plonge partiellement un bout de coton ou de papier à filtre dans une solution d'électrolytes et de matières colorantes. Ce phénomène est lié à des différences de potentiel entre la partie mouillée et non mouillée.

L'utilité du fil témoin se démontre facilement. Au contact du plasma de Mouton ou traversant le tissu cellulaire sous-cutané de Lapin peu de temps après la mort, le fil jaune de Bleu de Bromothymol, sans arriver à bleuir, devient nettement verdâtre.

Et, introduit sous la peau d'un membre humain immédiatement après l'amputation de celui-ci, ce fil contrôleur devient *nettement bleu*. Ce fait démontre incontestablement l'alcalinité du tissu cellulaire humain à l'indicateur choisi, encore dans les premiers moments après la mort, malgré l'anesthésie, la ligature élastique à la racine du membre et les conditions pathologiques imposant la mutilation : conditions toutes favorisant l'augmentation de la concentration locale en ions d'hydrogène. Si deux ou trois heures plus tard, les deux fils sont devenus jaunes, comme nous l'avons toujours vérifié, nous pouvons conclure que l'indicateur que nous avons choisi comprend bien la zone qui lui est destinée. Et, en plus, que ce réactif donne la sûreté d'indiquer encore la réaction de la vie sur un membre après la résection, c'est-à-dire au commencement du processus de la mort des tissus.

Nos recherches par cette méthode ont été nombreuses et ont été réalisées sur des cadavres d'âge différent et dont la mort datait de plus ou moins longtemps. Les cas les plus récents que nous ayons étudié, dataient de quatre heures, à une température moyenne de 12°; ils ont tous donné la réaction positive. Des membres inférieurs, amputés sous anesthésie générale à l'éther, au chloroforme ou au chlorure d'éthyle, ont présenté la réaction positive entre la deuxième et la quatrième heure. Dans ces derniers cas, l'intensité du bleuissement préliminaire du fil jaune, ainsi que la précocité du jaunissement terminal des deux fils ont été variables.

Il est évident que cette méthode est passible des critiques qu'on

peut opposer collectivement à toutes les méthodes proposées dans le même but. Il y a, dans l'état de mort apparente, une suspension temporaire de l'activité vitale. Mais, quelles sont les fonctions arrêtées, quelles sont les fonctions réduites et, parmi celles-ci, quel degré atteint cette réduction? Notre ignorance sur la physio-pathologie de la mort apparente (ou, peut-être mieux, de chaque cas de mort apparente) se justifie par l'impossibilité d'étudier une exception heureusement si rare. Si l'on admet que, dans cet état, il y a arrêt de la circulation, de la respiration et même de la plus intime activité cellulaire et interstitielle, il est bien sûr qu'aucune méthode ne pourra distinguer entre la mort réelle et ce véritable et paradoxal état de mort provisoire. Au contraire, si l'on admet que la mort apparente consiste dans la suspension constatable de l'activité vitale de l'organisme, alors la méthode que nous proposons s'impose comme basée sur les variations d'un équilibre chimique dont l'intégrité est défendue par l'organisme vivant à travers toutes les vicissitudes pathologiques. Entre les sucs cellulaires, le plasma interstitiel et le sang, il y a une élimination constante de facteurs d'acidité. Une concentration en ions hydrogène dépassant certaines limites, dans les liquides interstitiels et intra-cellulaires, démontre la rupture du mécanisme régulateur, l'arrêt de l'élimination indispensable à la vie, la mort définitive des tissus.

De nombreuses méthodes ont été proposées par leurs auteurs comme caractérisant la mort réelle. LECHA MARZO, dans son excellent traité, en donne un large aperçu. Cependant, il faut avouer que la plupart méritent à peine d'être citées. La détermination de la tension endo-oculaire par le tonomètre, l'examen ophtalmoscopique du fond des yeux, la recherche de l'immobilité ciliaire de l'épithélium respiratoire, l'évolution de la contractilité électrique des muscles et de la contraction idio-musculaire provoquée, la radiographie des organes abdominaux, ne présentent pas les conditions de praticabilité indispensable et, en outre, la plupart de ces signes sont incertains et tardifs.

La phlogose conjonctivale provoquée par l'éther ou la dionine, mettant même de côté d'autres objections possibles, peut-être empêchée, encore pendant la vie, par l'administration antérieure de certains médicaments tels que $CaCl_2$ (CHIARI & JANUSCHKE). Le signe de la phlyctène gazeuse obtenu par la brûlure superficielle de la peau n'a aucune valeur, selon ce que D'HALLUIN et d'autres ont pu vérifier.

Des signes tels que la réaction acide du foie et de la rate au papier de tournesol (BRISSEMORET & AMBARD) exigent la ponction viscérale par un trocart ou une grosse aiguille, et après l'élimination du sang du tissu recueilli par la ponction, le fragment séparé de l'organisme et *mort* doit présenter une réaction acide au tournesol ($p_H < 6,5$), comme il est propre à ces viscères (MICHAELIS).

ICARD, dont la haute compétence a été dirigée inlassablement

vers la solution de ce troublant problème, a proposé, successivement, trois méthodes bien connues : l'injection de fluorescéine sodique, laquelle, portée par le courant circulatoire, prêterait des colorations caractéristiques à la peau, aux muqueuses et aux milieux transparents de l'œil ; la collocation dans les narines du sujet d'une bande de papier réactif au sous-acétate de plomb noircissant au contact de H_2S développé par la putréfaction pulmonaire ; l'écrasement, par une pince à forcipressure, d'un pli cutané dont la lésion deviendrait parcheminée sur le cadavre et disparaîtrait sur le vivant, mais laissant suinter, dans les deux cas, de la sérosité dont on chercherait la réaction au papier de tournesol. Cependant, l'emploi de la fluorescéine n'a pas été généralisé dans la pratique, malgré ses défenseurs et certains avantages que cette méthode présente. Le papier réactif au sous-acétate de plomb dépend, dans sa réponse, de la putréfaction plus ou moins tardive et présente des causes d'erreur telles que l'existence de H_2S libre dans l'atmosphère, les gaz du tube digestif, peut-être même l'usage médicamenteux antérieur de produits sulfurés. La dernière méthode proposée par ICARD, la forcipressure, donne sa réponse à longue échéance si l'on doit attendre la parchemination de la lésion ; et le papier de tournesol, au contact de la moindre quantité de sérosité sourdie ne peut pas fournir un franc virage (WALPOLE).

La « cutiréaction » de DE DOMINICIS consiste dans le virage du papier de tournesol au contact d'une blessure produite par abrasion de la peau. La méthode de LECHA MARZO recherche la réaction des larmes au même papier réactif Les résultats de ces deux méthodes ne sont pas bien nets et sont souvent très tardifs. Selon LECHA MARZO, le papier pourpre de tournesol, vire au bleu pendant la vie, ne subissant aucun changement après la mort ou virant alors au rouge. La réaction des larmes, considérée par ALVAREZ DE TOLEDO comme alcaline pendant la vie et, en général, amphotère après la mort, dépend de l'état des conjonctives. Sur la précocité de la réaction de LECHA MARZO, de 50 cas étudiés par TOLEDO, 3 ont présenté la réaction positive après trente deux heures, 16 entre douze et trente deux heures et 31 cas avant douze heures.

La méthode de la cardio-puncture est sûrement plus dangereuse que certaine. L'immobilité de la sonde ou de l'aiguille ne peut suffire à démontrer la mort du cœur. Le cœur, même à découvert, peut induire en erreur : la cessation de ses mouvements visibles peut être démontrée trompeuse par l'usage de l'électrocardiographe (MINES, EINTHOVEN & HUGENHOLTZ, ARBEITER). S'il est possible de nous servir de procédés compliqués, certainement l'électrocardiographie est la seule méthode qui puisse actuellement démontrer, en cas de doute, la mort du cœur. Pourquoi ne pas éliminer alors toute violence irrespectueuse et toute incertitude, ayant recours à cette méthode là où

elle soit applicable, d'autant plus que, dans les hôpitaux et dans les cliniques, elle permettrait une précocité extrême aux autopsies? Par sa sensibilité, l'électrocardiographe est capable d'inscrire la variation de potentiel du cœur « mort » en systole par la digitale, distendu en diastole par le potassium, immobilisé par la paraffine fondue qu'on a laissé couler et durcir dedans. Bien mieux que l'inspection directe de l'organe, si elle était réalisable, cette méthode nous dévoile et nous inscrit la dernière lueur de vie dans le cœur. Nous ne savons pas si elle fut déjà proposée dans ce but. Devant la certitude que cette méthode peut donner, on ne doit pas hésiter dans son application toutes les fois qu'elle serait réalisable. D'autant plus que la méthode peut être très simplifiée par l'usage de l'électromètre capillaire de LIPPMANN relié à deux électrodes impolarisables (WALLER, BAYLISS, EINTHOVEN, GOTCH, KEITH-LUCAS).

Mais, laissant de côté la cardioscopie électrique, notre méthode des fils réactifs au Bleu de Bromothymol, comparée aux autres méthodes connues pour le diagnostic de la mort réelle, nous semble plus simple, plus sûre, plus inoffensive et plus précoce. La simplicité de sa technique la met à la portée des plus ignorants. Et ce fait n'est pas à mépriser dans les pays où l'autorité administrative peut, en l'absence du médecin, vérifier les décès. Dénué de toute connaissance médicale, un maire, usant de cette méthode sera à même de se prononcer sur ce problème de la mort réelle, lequel peut constituer, pour des gens autrement compétents, un des plus troublants problèmes de diagnostic.

L'inhumation précipitée est certainement plus que rare. Tout de même on en parle encore au coin du feu des petits villages perdus. On en parle encore même aux Académies. Dans les conditions actuelles de vérification des décès, en certaines circonstances, elle est encore possible.

Puisse l'étude et l'application de quelque méthode reconnue comme la meilleure, faire disparaître, comme le souvenir d'un cauchemar évanoui, la possibilité tragique.

BIBLIOGRAPHIE.

ARBEITER, W. C. A., Phénomènes électriques et mécaniques dans le cœur de la Grenouille. *Arch. Néerl. Physiol.*, V, 185, 1921.

BRISSEMORET et AMBARD, De l'acidification de certains viscères, etc., considérée comme signe certain de la mort. *C. R. Soc. Biol.*, 456, 1904.

CHIARI R. und JANUSCHKE H., Hemmung von Transsudat- und Exsudatbildung durch Calziumsalze. *Arch. exp. Path. u. Pharmakol.*, LXV, 120, 1911.

CROZIER, W. J., Cell penetration by acids. *J. Biol. Chem.*, XXIV, 255, 1916.
ID., Some indicators from animal tissues. *Ibid.*, XXIV, 443, 1916.
ID., On indicators in animal tissues. *Ibid.*, XXXV, 445, 1918.
DE DOMINICIS, *in* LECHA MARZO.
EINTHOVEN, W. et HUGENHOLTZ, F., L'électrocardiogramme tracé dans le cas où il n'y a pas de contraction visible du cœur. *Arch. Néerl. Physiol.*, V, 174, 1921.
GOTCH, F., The succession of events in the contracting ventricle as shown by electrometric records. *Heart*, I, 235, 1909.
HAAS, The acidity of plant cells as shown by natural indicators. *J. Biol. Chem.*, XXVII, 233, 1916.
D'HALLUIN, *in* LECHA MARZO.
HASSELBALCH, K. A., Elektrometrische Reaktionbestimmung kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten. *Bioch. Zeitschr.*, XXX, 317, 1911.
ID., Verbesserte Method. bei d. elektrom. Reaktionbestimm. biolog. Flüssigkeiten. *Ibid.*, XLIX, 451, 1913.
ICARD, S., La mort réelle et la mort apparente. Paris, 1917.
ID., De la réalité du danger de la mort apparente. *Presse méd.*, août 1904.
ID., Le danger de la mort apparente sur les champs de bataille. Paris, 1905.
ID., A propos du diagnostic de la mort réelle, dans la pratique journalière des armées. *R. Pathol. comp.*, XVIII, n° 147, 1918.
ID., L'acidité cadavérique, signe de mort réelle. Cuti-réaction physicochim. par la forcipressure. *Ibid.*, XIX, n° 158, 1919.
KEITH-LUCAS, On the relation between the electric disturbance in muscle and the propagation of the excited state. *J.Physiol.*, XXXIX, 207, 1909.
KELLER, R., Die Elektrizität in der Zelle. Wien u. Leipzig, 1918.
LECHA MARZO, Tratado de autopsias. Madrid, 1917.
LEWIS, T., The mechanism and graphic registration of the heart beat. London, 1920.
MATHEWS, A. P., Physiol. Chemistry. London, 1919.
MATHEWS, A. P., and LONGFELLOW E., The toxicity of Martius yellow, etc. and the entrance of dyes into cells. *J.Pharmacol. and Exper. Therap.*, II, 201, 1910.
MICHAELIS, L., Die Wasserstoffionenkonzentration. Berlin, 1914.
ID. und KRAMSZTYK, Die Wasserstoffionenkonzentration der Gewebssäfte. *Bioch. Zeitschr.*, LXII, 180, 1914.
MINES R. G., On functional analysis of the action of electrolytes. *J. Physiol. Chem.*, XLVI, 188, 1913.
ID., On dynamic equilibrium of the heart. *Ibid.*, XLVI, 349, 1913.
PRIDEAUX, E. B. R., The theory and use of indicators. An account of chemical equilibria, etc. London, 1917.

REBELLO SILVIO, La réaction actuelle des tissus au bleu de bromothymol. Une méthode pour le diagnostic de la mort réelle. *C. R. Soc. Biol.*, Mars, 1922.

ID., A concentração hidrogenionica dos tecidos animaes e a sua variação post mortem. Um método para o diagnostico da morte real. *Arch. de Medicina Legal*, III, 1922.

REBELLO, S. e BENEDICENTI, A., L'Ematossilina come reattivo del Rame-ione e dei complessi imperfetti del Rame. *Arch. Farmacol. sper. e Scienze affini*, XXIV, 1917.

SÖRENSEN, S. P. L., Enzymstudien, I. *Bioch. Zeitschr.*, VII, 45, 1907.

ID., Enzymstudien, II. *Ibid.*, XXI, 131, 1909.

TOLEDO ALVAREZ, *in* LECHA MARZO.

WALLER, A. D., A demonstration on man of the electromotive changes accompanying the heart beat. *J. Physiol.*, VIII, 229, 1887.

WALPOLE, G. S., The use of litmus paper as a quantitative indicator of reaction. *Bioch. J.*, VII, 260, 1913.

LABORATOIRE DE LA CLINIQUE MÉDICALE DE GENÈVE
DIRECTEUR : PROFESSEUR ROCH.

Recherches expérimentales sur l'action de l'arsylène

PAR

S. KATZENELBOGEN,
Assistant.

L'emploi de plus en plus préconisé des méthylarsinates à hautes doses a augmenté l'intérêt et le nombre des indications de la médication arsénicale. A coté des nouvelles propriétés attribuées à l'arsenic et dont l'étude ne fait que débuter, l'action tonifiante et reconstituante de ce corps n'est plus guère mise en doute actuellement. Ces avantages ont surtout été reconnus dans les anémies du type globulaire et font généralement passer l'arsenic pour un médicament hématopoïétique au même titre que le fer, ce dernier étant surtout indiqué dans les anémies hémoglobiniques.

Les études expérimentales sur l'arsenic sont relativement peu nombreuses par rapport aux observations cliniques et n'attribuent pas à ce médicament une réputation d'agent hématopoïétique.

En effet, les auteurs, qui se sont occupés expérimentalement de l'action de l'arsenic sur le sang, arrivent à des conclusions qui sont loin d'appuyer les données des cliniciens. C'est ainsi que STIERLIN (1), administrant de la liqueur de Fowler à un lapin normal, a trouvé que de petites doses n'ont pas influencé sensiblement le nombre des globules rouges, tandis que de fortes doses ont produit une diminution de ces éléments.

BETTMANN (2) dans un important travail, basé sur de nombreuses expériences, trouve que chaque injection d'arsenic est suivie d'une augmentation très passagère du taux globulaire ; ce dernier diminue au contraire dans les intoxications subaiguës. L'examen histologique des moëlles osseuses de lapins intoxiqués permet cependant d'admettre que l'arsenic est doué d'une action hématopoïétique spécifique.

Pour BLOCH (3) l'arsenic exercerait sur le sang et les organes hématopoïétiques une action destructive, suivie de rénovation intense faisant généralement monter le nombre des globules rouges au-dessus

du chiffre initial. Il s'agirait donc pour cet auteur d'une excitation indirecte de l'hématopoïèse, analogue à celle qui est provoquée par les sérums hémolytiques (4), par la radiothérapie (5) ou même par la saignée.

Il est regrettable que ces deux derniers auteurs n'aient expérimenté qu'avec des doses toxiques ou très élevées, ce qui, — en vertu de la loi biologique, qui admet qu'une même substance ayant une action excitante à dose modérée devient à dose élevée inhibitrice ou destructrice — ne permet pas de juger de ce qu'est l'action thérapeutique des doses faibles.

RIVA (6), dans ses expériences sur les chiens anémiés artificiellement, constate que l'arsenic favorise la formation des globules rouges. Chez le lapin et la grenouille, SILBERMANN (7) observe, sous l'influence de préparations arsénicales, un abaissement du taux globulaire. Enfin, parmi les travaux récents traitant de l'action de l'arsénobenzol sur le sang, il faut noter ceux de JAKIMOFF et de FERRANINI (8) qui, soit chez l'homme, soit chez l'animal, ne trouvent aucune modification du nombre des globules sous l'influence de ce corps.

Telles sont les données des principaux travaux publiés à ce sujet. Malgré leur discordance apparente, il s'en dégage la notion que l'arsenic employé à fortes doses est un destructeur des éléments du sang, et n'est que peu ou pas du tout actif à faibles doses; ces données cadrent mal avec les succès thérapeutiques que les arsénicaux donnent en clinique.

C'est cette discordance entre l'expérimentation et l'empirisme thérapeutique qui nous a engagé à faire des recherches expérimentales avec une nouvelle préparation arsénicale, l'arsylène « Roche » qui a donné de bons résultats cliniques dans le service du Prof. ROCH. —

Propriétés physico-chimiques de l'arsylène.

L'arsylène est un propényl-arsinate monosodique, contenant 40 % d'arsenic et possédant la formule suivante:

$$O = As \begin{cases} ONa \\ —CH^2 — CH = CH^2 \\ OH \end{cases}$$

Ce corps se présente sous forme d'une poudre blanche, inodore, de saveur salée et rafraîchissante, très soluble dans l'eau, assez facilement dans la glycérine et peu soluble dans l'alcool. La solution aqueuse possède une réaction neutre et ne subit aucune modification jusqu'à la température de 120°. — Sa formule chimique montre que ce sel est un homologue supérieur du méthyl-arsinate de soude (Arrhénal). — Son acide générateur peut être considéré comme un dérivé

de l'acide arsénique par remplacement d'un oxhydrile par le radical C^3H^5 (propényle) :

$$O = AS \begin{cases} OH \\ OH \\ OH \end{cases} \qquad O = AS \begin{cases} OH \\ OH \\ CH^2 - CH = CH^2 \end{cases}$$

Acide arsénique — Acide propénylarsénique

On remarque, dans cette formule, l'absence d'un second radical alcoolique, lequel est présent dans les cacodylates et contribue à la formation de l'oxyde de cacodyle. — On sait que ce dernier a une odeur alliacée qui incommode parfois beaucoup les malades auxquels on administre le cacodylate de soude ; cet inconvénient empêche souvent de continuer ce médicament. A priori, on peut donc supposer que cette nouvelle préparation arsénicale pourra être donnée sans inconvénients par voie gastrique.

Méthode d'expérimentation.

Nous groupons en 4 séries nos observations sur les modifications sanguines produites par l'arsylène :

1. Intoxication aiguë.

2. Administration prolongée de doses élevées, réalisant ainsi une intoxication chronique.

3. Administration de doses faibles, soit thérapeutiques.

4. Étude de la résistance globulaire.

Nous avons expérimenté sur des lapins âgés de 6 à 10 mois. Le sang prélevé à la veine marginale de l'oreille a été examiné avec l'appareil de Hayem-Nachet avant chaque injection, et nous avons pratiqué ces opérations le matin entre 8 et 10 heures. Notons enfin que de nombreuses vérifications d'examens de sang nous amenèrent à évaluer les causes d'erreur de technique à 5-6 %, c. à. d. que dans nos expériences sur les lapins à sang normal, les différences de 300.000 ne doivent pas être prises en considération.

Toxicologie.

L'administration par voie souscutanée ou intraveineuse ne fait pas — de même que pour l'acide arsénieux — varier sensiblement la toxicité de l'arsylène. Le tableau suivant résume nos expériences concernant la toxicité de ce corps et de l'acide arsénieux pour quelques animaux de laboratoire. Les dosages sont indiqués par kilo d'animal :

	Arsylène		Acide arsénieux.	
	Dose tolérée	Dose toxique	Dose tolérée	Dose toxique
Souris	0.30	0.40	0.01	0.0125
Rat.	0.25	0.35	0.01	0.015
Lapin.	0.05	0.075	0.0075	0.01

Il résulte de ces expériences que l'arsylène est beaucoup moins toxique que l'acide arsénieux. Le rat et la souris supportent des doses de 25 à 30 fois supérieures à celles de l'acide arsénieux. Pour le lapin, qui nous occupe spécialement dans ce mémoire, l'écart n'est pas aussi considérable ; mais le tableau ci-dessus nous montre que l'arsylène est encore 7 1/2 fois moins toxique que l'acide arsénieux (1).

La faible toxicité de certains composés organiques s'expliquerait selon le Prof. MAYOR (9) de la manière suivante : « Le corps composé ne met point en liberté tout le toxique qu'il contient ». Cette explication trouve d'une part sa confirmation dans les recherches de PAGEL et HEFFTER (10) qui ont montré qu'après l'injection de cacodylate de soude la plus grande partie de l'arsenic contenue dans ce sel s'élimine sous forme de sels de l'acide cacodylique ; une petite partie seulement est éliminée sous forme d'arsénites et d'arséniates ; d'autre part, on a démontré que le thiocol (9) en se dédoublant dans l'organisme ne met pas en liberté toute la quantité de guaïacol qu'il renferme. A priori, on doit supposer que l'arsylène se comporte de même, ce qui serait à démontrer en étudiant la forme sous laquelle il est éliminé. La dose de 0,06 par kg. d'animal, qui est parfaitement supportée chez un lapin en injection souscutanée, est mortelle en injection intraveineuse. La dose de 0,05 par kg. d'animal est tolérée par les deux voies et doit être considérée comme dose maximale.

1. *Intoxication aiguë.* — (*Voir le tableau* 1).

Exp. I. *Lapin de* 1390 *gr.*

L'injection souscutanée de 0,075 par kg. a provoqué la mort de l'animal au bout de 42 heures. Le sang réexaminé 24 h. après

(1) Pour données plus précises sur la toxicité de l'acide arsénieux chez le lapin, nous renvoyons au mémoire de K. MORISHIMA (ces *Archives*, 1900, vol. VII, p. 75) et à celui de L. DE BUSSCHER (ces *Archives*, 1902, vol. X, p. 418).

l'injection a montré une baisse du taux des globules rouges de 500.000. L'hémoglobine au Tallquist n'a pas changé, d'où il résulte une légère augmentation de la valeur globulaire. Les globules blancs ont diminué de 9000 et la formule leucocytaire du sang prélevé 7 h. et 24 h. après l'injection a montré une augmentation des neutrophiles aux dépens des lymphocytes.

Exp. 2. *Lapin de* 2775 *gr.*

L'injection endoveineuse de 0.075 par kg. a entraîné la mort de l'animal au bout de 4 jours. Le sang, réexaminé trois fois de suite, a montré une diminution de globules rouges de 800.000, le 3me jour après l'injection. En dépit de cette diminution le sang était plus foncé et l'hémoglobine au Tallquist a donné 100 au lieu de 90, chiffre initial ; cette coloration plus foncée pourrait s'expliquer par l'accumulation de CO^2 dans le sang, due au ralentissement de la respiration.

Comme phénomène d'intoxication arsénicale, les deux lapins intoxiqués accusaient de la faiblesse et de l'angoisse, surtout quelques heures avant leur mort.

Il paraît paradoxal que l'administration par voie veineuse assure une survie plus longue de deux jours que l'administration de la même dose par la voie souscutanée. Faut-il en déduire que le médicament en question injecté dans la veine agit moins rapidement que par la voie souscutanée ? Nous croyons qu'il s'agit ici de susceptibilités individuelles différentes (1).

Exp. 3 et 4. *Lapin de* 2900 *et de* 2580 gr.

Ces deux lapins ont reçu 0.06 par kg. d'animal, l'un sous la peau et l'autre dans la veine marginale de l'oreille. Supportée par le premier, cette même dose a fait succomber le second au bout de deux jours. Le sang réexaminé chez le premier 3 fois en 10 jours n'a montré aucun changement sensible ; chez le second le sang n'a pas été réexaminé.

2. *Administration prolongée de doses élevées.* — (*Voir tableau* 2).

Exp. 5. *Lapins de* 2650 *gr.*

Cet animal a reçu chaque jour une dose de 0,015 par kg. d'animal pendant 5 semaines. Les examens quotidiens du sang ont montré, les 10 premiers jours, des diminutions insignifiantes du taux des globules rouges, sauf le 7me jour où il se produisit une augmentation de 700.000. Le 10me jour la diminution était considérable, soit de 2.000.000 ; cet abaissement brusque reste pour nous inexplicable, du fait que les jours suivants nous constations des augmentations allant jusqu'à 1.000.000 au-dessus du taux globulaire initial. A partir du 20me jour et jusqu'à la fin de l'expérience, le taux des globules rouges se maintint légérement au-dessous du chiffre initial.

L'hémoglobine n'a pas varié sensiblement. Quant au nombre des globules blancs, ils accusèrent une courbe irrégulière, sans présen-

(1) Cfr. MORISHIMA, loc. cit.

ter toutefois une amplitude de variation très accentuée. En ce qui concerne la formule leucocytaire, les lymphocytes tendirent à l'augmentation dès les premiers jours de l'expérience ; puis, 2 semaines après et jusqu'à la fin de l'expérience, ils présentèrent des augmentations notables aux dépens des neutrophiles. Enfin, signalons les globules rouges nucléés que nous avons constatés plusieurs fois au cours de cette expérience et qui n'ont pas été observés chez les lapins neufs.

3. *Administration répétée de doses thérapeutiques faibles.* — (*Voir le tableau* 3).

Exp. 6. *Lapin de* 2100 *gr.*

Ce lapin a reçu chaque jour sous la peau 0,001 par kg. d'animal, durant 8 jours ; le lendemain de la première injection, nous avons constaté une augmentation de 800.000 globules rouges montant les jours suivants jusqu'à 1.000.000 Après la cessation des injections le nombre globulaire est redescendu au bout de 5 jours à un taux voisin de la normale.

L'hémoglobine est montée de 85 % à 90-95 %. Les globules blancs ont varié de 8000 à 18.000, sans suivre la courbe d'augmentation des globules rouges. Quant à la formule leucocytaire, elle n'a pas été modifiée sensiblement.

Exp. 7. *Lapin de* 2450 *gr.*

Cet animal a reçu également 0.001 par kg., par jour. Pendant les 7 premiers jours où fut administré l'arsylène, l'augmentation globulaire se maintint autour de 1.000.000 ; 3 jours après l'arrêt des injections, le nombre globulaire redescendit au chiffre initial.

Les injections quotidiennes d'une même dose, refaites pendant 7 jours subséquents, provoquèrent des augmentations moins accusées — de 400.000 à 800.000 — ; enfin, après l'administration d'une dose plus forte, soit 0.002 par kg. pendant 5 jours, l'augmentation maximale fut de 1.200.000. Après l'arrêt des injections, le taux globulaire retomba graduellement, au bout de 7 jours, à la normale. Les résultats de ces deux expériences démontrent l'action hématopoïétique de l'arsenic justifiant ainsi les prescriptions, jusqu'ici empiriques, des thérapeutes. On constate un parallélisme complet entre l'augmentation globulaire et l'administration de l'arsylène, parallélisme permettant d'établir entre ces deux faits des relations de cause à effet.

Bien qu'ignorant le mécanisme d'action de l'arsenic, malgré les nombreuses théories émises (2-3-11), nous nous sommes demandé si les augmentations globulaires constatées ne sont pas dues aux phénomènes vasomoteurs provoqués soit par l'irritation de la région piquée, soit par l'introduction du liquide injecté indépendamment de sa nature. Cette supposition nous a engagé à suivre pendant 10 jours deux lapins (voir tableau 4, exp. 8 et 9), le premier recevait chaque jour par voie souscutanée 1 cc. de sérum physiologique et le second servait de témoin. Les examens quotidiens du sang n'ont

montré chez les deux lapins que des augmentations insignifiantes rentrant dans les limites d'erreurs de la technique.

Ces résultats concordent avec ceux de BETTMANN (2) lequel n'a également pas observé de modifications du nombre globulaire après des injections de 1 cc. de sérum physiologique. D'autre part, J. CHERON (12) prétend que les injections de 5 cc. de sérum physiologique et même l'irritation seule de la peau provoquent de la polyglobulie ; cette indication n'infirme pas nos résultats, car cette polyglobulie a été constatée sur du sang prélevé 10 minutes après la piqûre, tandis que nos examens ont été faits sur du sang recueilli, comme dans les expériences précédentes, 24 heures après l'injection. Nous sommes donc autorisé à dire que dans nos expériences l'action réflexe, due à la piqûre elle-même, n'a pas pu constituer une cause d'erreur infirmant nos conclusions.

Il serait cependant trop hardi d'attribuer au produit en question une action spécifique sur l'hématopoïèse, seulement en raisonnant par exclusion, sans avoir des preuves directes. L'examen éventuel des organes hématopoïétiques pourrait peut-être nous fournir ces preuves, quoique les recherches histologiques de BETTMANN et de BLOCH, citées plus haut, n'aient pas apporté des données bien nettes et affirmatives à ce sujet.

Enfin, en vue de vérifier les résultats de nos expériences 6 et 7, nous avons refait encore deux expériences analogues.

Exp. 10 *et* 11 (*voir le tableau* 5)

Deux lapins de 2132 et de 2337 gr. ont reçu, l'un pendant 8 jours et l'autre pendant 9 jours, des doses quotidiennes de 0.001 à 0.002 par kg. en injections souscutanées ; mais ces doses, qui dans les expériences précédentes nous avaient donné des augmentations notables, sont restées cette fois-ci inactives.

Toutes nos expériences ayant été faites dans les mêmes conditions, nous ne pensons pas devoir attribuer ces résultats contradictoires à des causes d'erreur. Mais il nous semble que pour les expliquer, il faut faire intervenir la capacité des divers organismes de réagir différemment vis-à-vis d'un même phénomène ; explication aussi peu originale que facile, mais nous paraissant toutefois correspondre aux faits observés.

Action sur la résistance globulaire.

Les études sur les modifications de la résistance globulaire sous l'influence de préparations arsénicales ne sont pas nombreuses.

BETTMANN (2), qui a travaillé cette question au moyen d'une méthode spéciale utilisant les solutions iodo-iodurées et de NaCl, conclut que, dans l'intoxication arsénicale chronique, la résistance globulaire diminue.

Mais BLOCH (3), par la méthode des solutions chlorurées, trouve que l'intoxication arsénicale aiguë provoque une diminution, surtout

de la résistance minima; dans l'intoxication chronique, les résultats de ses deux expériences sont discordants: augmentation dans un cas et diminution dans l'autre. Mais cet auteur, en se basant sur les résistances globulaires normales, — variables cependant chez différents lapins—ne mesurait pas la résistance avant l'introduction de l'arsenic; cette négligence enlève de la valeur à ses données, et la défibrination du sang destiné à la mesure de la résistance globulaire pouvait, elle aussi, être la cause d'une augmentation de la fragilité globulaire, comme du reste l'auteur lui-même le reconnait.

Les données des travaux récents s'occupant des modifications de la résistance globulaire sous l'influence de l'arsénobenzène sont singulièrement contradictoires: tandis que Lévy-Bing, Duroeux, et M. Dogny (13) trouvent une diminution, Mathieu, Pierre Weil et Louis Guénot (8) constatent une augmentation surtout de la résistance minima, augmentation qui se maintient généralement encore 15 jours après la dernière injection.

Dans nos recherches faites avec la méthode des solutions chlorurées, nous avons étudié la résistance globulaire dans l'intoxication aiguë, subaigüe et chronique, et sous l'influence de doses thérapeutiques répétées.

Exp. 12. *Lapin de* 2775 *gr.* Rmn = 0.54 ; Rmx = 0.30
Inj. i. v, de 0.075 *par kg.*

4 heures après l'injection : Rmn = 0.52, Rmx = 0.30
3 jours » » : Rmn = 0.52 ; Rmx = 0.32

Exp. 13. *Lapin de* 2900 *gr.* Rmn = 0.52 ; Rmx = 0.36
Inj. s. c. de 0.06 *par kg.*

18 heures après l'injection : Rmn = 0.48 ; Rmx = 0.36
2 jours » » : Rmn = 0.50 ; Rmx = 0.34
8 jours » » : Rmn = 0.52 ; Rmx = 0.38

Exp. 14. *Cobaye de* 400 *gr.* Rmn = 0.44 ; Rmx = 0.30
Inj. s. c. quotidiennes de 0.015 *par kg. pendant* 6 *semaines* : Rmn = 0.44; Rmx = 0.30

Exp. 15. *Lapin de* 2200 gr. Rmn = 0.52 ; Rmx = 0.32

Après 12 injections s. c. de 0.001 par kg. : Rmn = 0.50 ; Rmx = 0.30
» 8 » » 0.002 » : Rmn = 0.52 ; Rmx = 0.28

Ces expériences montrent que ni la résistance minima, ni la résistance maxima n'ont été modifiées sous l'influence de l'arsylène, les différences notées étant trop minimes pour être prises en considération. D'autre part, les essais *in vitro* nous ont montré que l'adjonction d'arsylène au mélange de sang et de sérum physiologique ne produit pas de laquage du sérum après centrifugation. Il résulte

de nos recherches que l'arsylène même à fortes doses n'est ni hémolylant, ni capable de diminuer la résistance des globules rouges. On ne peut donc pas le ranger à côté des sérums hémolytiques comme c'est se cas, d'après BLOCH, pour l'arséniate de soude.

Quant à l'explication du mécanisme de la diminution globulaire que nous avons constatée dans l'intoxication aiguë et chronique, on peut émettre l'hypothèse d'une action inhibitrice sur la moëlle osseuse, avec ou sans destruction suivant la dose : une forte dose agirait sur la moëlle en diminuant le nombre d'érythrocytes qu'elle fait passer d'ordinaire dans la circulation en compensation des pertes physiologiques.

En résumé, nos recherches nous permettent de formuler ce qui suit:

1. — La dose toxique d'arsylène pour les lapins par voie parentérale est de 0.075 pai kg. d'animal ; la dose maximale tolérée est de 0.05 par kg.

2. — L'arsylène n'est pas hémolytique *in vitro* et il n'influence pas la résistance globulaire.

3. – Dans l'intoxication aiguë, l'arsylène injecté à la dose indiquée plus haut ne fait diminuer que légèrement le nombre des globules rouges et l'hémoglobine, qui a plutôt une tendance à augmenter ; quant à l'équilibre leucocytaire, il y a augmentation des neutrophiles aux dépens des lymphocytes.

4. — Dans l'intoxication chronique, il y a légère diminution des globules rouges ; le nombre des globules blancs se traduit par une courbe irrégulière, la formule leucocytaire présente le phénomène inverse de ce que nous avons observé dans l'intoxication aiguë, c. à. d. qu'il y a augmentation des lymphocytes aux dépens des polynucléaires.

5. — L'arsylène administré aux doses thérapeutiques a provoqué une hyperglobulie notable chez deux lapins, dont l'un a réagi à la seconde période d'administration de la dose. L'hémoglobine n'a pas augmenté proportionnellement et le nombre des globules blancs a été variable ; l'équilibre leucocytaire n'a pas changé sensiblement. Par contre, deux autres lapins se sont montrés réfractaires à ces doses.

6. — La différence d'action suivant les lapins considérés correspond bien aux faits observés en clinique avec le traitement arsénical ; ce n'est qu'en multipliant les expériences qu'on sera à même de juger si l'emploi des arsénicaux dans les anémies hypoglobulaires se justifie par l'expérience.

Nous sommes heureux de pouvoir exprimer ici à Monsieur le Professeur ROCH, notre respectueuse et profonde gratitude pour sa bienveillance constante et ses précieux conseils.

Tableau 1. Intoxication aiguë.

Dates	Gl. r.	Gl. bl.	Hb.	v. gl.	Arsylène
Exp. 1. Normal	5.208.000	21.700	85	0.81	0
13-IX	—	—	—	—	0 075 inj s.c. p. kg.
14-IX	4.650.000	12.400	85	0.92	
15-IX	+ au bout de 42 heures.				
Exp. 2. Normal	6.386.000	6.200	90	0.71	—
9-XII	—	—	—	—	0.075 i. v.
3 h. après l'inj.	5.952.000	12.400	90	0.76	—
10-XII	6.076.000	7.200	95	0.79	—
12-XII	5.580.000	9.300	100	0.86	—
13-XII	+				
Exp. 3. Normal	5.626.000	9.300	90	0.80	—
22-XII	—	—	—	—	0.06 s. c. par kg.
23-XII	5.776.000	6.200	95	0.83	—
27-XII	6.262.000	9.500	95	0.76	—
31-XII	5.456.000	7.750	95	0.88	—
Exp. 4. Normal	6.014.000	8.060	90	0.75	
3-I	—	—	—	—	0.06 i. v.
5-I	+				

Tableau 2. Intoxication chronique.

Exp. 5. Normal	6.262.000	10.850	75	0.65	—
5-IX	—	—	—	—	0.015 s. c. p. kg.
6-IX	6.076.000	9.300	75	0.58	0.015
7-IX	5.642.000	9.920	70	0.60	0.015
9-IX	6.364.000	6.200	75	0.60	0.015
10-IX	5.890.000	7.750	75	0.64	0.015
12-IX	5.580.000	6.200	70	0.64	0.015
13-IX	6.944.000	10.850	80	0.50	0.015
14-IX	5.394.000	15.500	70	0.66	0.015
15-IX	4.092.000	9.300	70	0.87	0.015
16-IX	6.944.000	18.600	80	0.60	0.015
17-IX	6.510.000	10.850	80	0.60	0.015
18-IX	6.844.000	8.060	80	0.58	0.015
20-IX	6.882.000	12.400	85	0.58	0.015
21-IX	7.130.000	15.500	85	0.60	0.015
22-IX	6.324.000	7.750	80	0.63	0.015
23-IX	7.006.000	24.800	85	0.60	0.015
24-IX	6.014.000	15.500	85	0.70	0.015
26-IX	5.518.000	11.470	80	0.72	0.015
27-IX	6.448.000	18.600	80	0.60	0.015
28-IX	5.456.000	7.440	80	0.70	0.015

Dates		Gl. r.	Gl. bl.	Hb.	v. gl.	Arsylène
Exp. 5.						
	29-IX	5.332.000	24.800	75	0.70	0.015
	1-X	6.200.000	1.140	80	0.64	0.015
	3-X	6.138.000	12.400	80	0.64	0.015
	4-X	5.704.000	11.680	75	0.65	0.015
	5-X	5.580.800	17.980	70	0.64	0.015
	6-X	6.200.000	15.500	80	0.64	0.015
	7-X	5.704.000	12.400	75	0.65	0.015
	8-X	5.766.000	18.600	75	0.65	0.015
	10-X	5.828.000	13.020	75	0.64	

Tableau 3. Inj. de doses faibles.

Exp. 6.	Normal	6.014.000	15.500	85	0.70	—
	12-X	—	—	—	—	0.001 s. c. p. kg.
	13-X	6.820.000	16.740	85	0.60	0.001
	14-X	6.448.000	12.400	85	0.66	0.001
	15-X	7.030.000	8.060	90	0.63	0.001
	17-X	6.882.000	8.990	90	0.65	0.001
	18-X	7.068.000	15.500	95	0.68	0.001
	19-X	6.510.000	9.300	85	0.65	0.001
	20-X	6.448.000	18.600	85	0.66	0.001
	21-X	7.130.000	13.330	90	0.63	—
	22-X	7.006.000	12.400	90	0.63	—
	24-X	6.076.000	6.200	85	0.70	—
	25-X	6.234.000	12.710	85	0.68	—
	26-X	6.448.000	9.300	90	0.70	—
Exp. 7.	Normal	6.138.000	6.200	85	0.70	—
	26-X	—	—	—	—	0.001
	27-X	7.454.000	9.300	85	0.74	0.001
	28-X	7.254.000	14.640	85	0.57	0.001
	29-X	6.882.000	12.400	85	0.62	0.001
	31-X	6.866.000	17.980	85	0.66	0.001
	1-XI	7.006.000	18.600	90	0.64	0.001
	2-XI	6.786.000	11.780	90	0.67	0.001
	3-XI	7.192.000	15.500	90	0.63	—
	4-XI	6.386.000	8.060	85	0.70	—
	5-XI	6.014.000	11.680	90	0.75	—
	7-XI	6.324.000	6.820	90	0.71	—
	8-XI	6.076.000	15.120	80	0.66	—
	9-XI	6.944.000	12.400	90	0.65	0.001
	10-XI	6.820.000	6.820	90	0.66	0.001
	11-XI	6.634.000	11.544	80	0.64	0.001
	12-XI	6.694.000	9.300	85	0.64	0.001
	14-XI	6.448.000	7.750	85	0.66	0.001
	15-XI	6.750.000	16.120	85	0.63	0.001
	16-XI	6.634.000	6.200	85	0.68	0.001
	17-XI	6.572.000	—	85	0.65	0.002

Dates	Gl. r.	Gl. bl.	Hb.	v. gl.	Arsylène
					0.002
18-XI	6.694.000	5.580	85	0.64	0.002
19-XI	6.758.000	6.200	90	0.67	0.002
21-XI	7.068.000	15.500	90	0.64	0.002
22-XI	7.378.000	21.700	95	0.65	—
23-XI	7.006.000	18.600	95	0.68	—
24-XI	6.944.000	16.430	95	0.68	
26-XI	6.694.000	10.230	90	0.68	—
28-XI	7.572.000	—	90	0.69	—
29-XI	6.200.000	—	85	0.68	—

Tableau 4. Injections de sérum physiologique.

					Sérum physiol.
Exp. 8. Normal	6.138.000	9.300	85	0.70	
29-XI	—	—	—	—	1 cc. s. c.
30-XI	6.200.000	16.554	85	0.68	1 cc.
2-XII	5.842.000	9.300	85	0.73	1 cc.
3-XII	6.076.000	—	85	0.70	1 cc.
5-XII	6.200.000	6.200	85	0.68	1 cc.
6-XII	6.510.000	10.850	90	0.81	1 cc.

Examens du sang d'un lapin normal.

Exp. 9.					
26-X	5.856.000	11.470	75	0.74	
27-X	6.062.000	14.640	80	0.64	
28-X	5.890.000	17.670	80	0.71	
29-X	5.642.000	15.500	80	0.71	
30-X	6.200.000	21.700	80	0.72	
1-XI	6.076.000	8.370	80	0.67	
2-XI	5.580.000	24.800	80	0.72	
3-XI	5.642.000	18.600	80	0.70	
4-XI	5.456.000	15.500	80	0.74	
5-XI	5.580.000	5.890	80	0.72	
7-XI	5.332.000	9.300	80	0 75	

Tableau 5. Inj. de doses faibles d'arsylène.

					Arsylène
Exp. 10. Normal	5.890.000	6.200	85	0.73	—
29-XI	—	—	—	—	0.001 s. c. p. kg.
30-XI	6.386.000	9.300	85	0.67	0.001
1-XII	6.324.000	12.400	85	0.67	0.001
2-XII	5.580.000	12.160	85	0.77	0.001
3-XII	5.704.000	8.990	85	0.74	0.001
à 9 h. 5-XII	5.890.000	10.230	85	0.73	—
à 15 h. 5-XII	6.138.000	18.600	85	0.70	0.002
à 17 h. 5-XII	6.810.000	—	90	0.60	0.002
6-XII	6.324.000	7.750	90	0.71	0.002

Exp. 11. Normal	6.076.000	10.850	90	0.75	—
8-XII	6.386.000	14.671	90	0.71	—
9-XII	6.138.000	9.300	90	0.73	—
10-XII	5.828.000	—	90	0.77	—
12-XII	5.709.000	12.400	90	0.78	0.001
13-XII	6.107.000	15.500	90	0.73	0.001
14-XII	6.138.000	6.200	90	0.73	0.001
15-XII	6.324.000	10.540	90	0.71	—
16-XII	6.828.000	—	90	0.77	0.002
17-XII	6.510.000	3.100	90	0.70	0.002
19-XII	6.324.000	9.300	85	0.66	0.002
20-XII	6.696.000	12.400	85	0.64	0.002
21-XII	5.890.000	15.500	85	0.73	0.002
22-XII	6.014.000	18.910	85	0.70	0.002

LITTÉRATURE

1. ROBERT STIERLIN. — Blutkörperchenzählungen und Hämoglobinbestimmungen bei Kindern. — *Deutch. Arch. f. klin. Medizin* 1889. p. 266.
2. BETTMANN. — Ueber den Einfluss des Arseniks auf das Blut und das Knochenmark des Kaninchens. — *Beiträge zur patholog. Anatomie* 1898. p. 377.
3. BLOCH. — Action de l'arsenic sur le sang et les organes hématopoïétiques. — *Thèse de Paris* 1907-08.
4. CANTACUZÈNE. — Variations quantitatives et qualitatives des globules rouges par les injections de sérums hémolytiques. — *Ann. Inst. Past.* 1900 p. 378. ANDRÉ. — Les sérums hémolytiques. — *Thèse de Lyon*, 1903.
5. BEAUJARD. — La radiothérapie dans les leucémies. — *Thèse de Paris*, 1905. — AUBERTIN ET BEAUJARD, d'après Bloch (3)
6. RIVA. — *Münch. med. Wochenschr. No.* 16, 1900 p. 551.
7. SILBERMANN d'après Bloch (3)
8. JAKIMOFF, FERRANINI, d'après MATHIEU, PIERRE WEIL, et LOUIS GUÉNOT. De la rénovation sanguine déterminée chez les syphilitiques par le dioxydiamidoarsénobenzol. — *Presse Méd.* 7 janv 14 p. 13.
9. A. MAYOR. — Cacodylate et vanadate de Soude. — *Revue méd. de la Suisse Romande* 1904, p. 711.
10. PAGEL et HEFFTER d'après A. MAYOR (9).
11. BING und SCHULZ. — *Arch. f. exp. Pathologie und Pharmacologie, vol. XI*, 30 *juill.* 1879, *p.* 200 ; — *vol. XIII*, 20 *janv.* 1881, *p.* 256 ; — *vol. XIV*, 12 *oct.* 1881, *p.* 345 : — *vol. XV*, 22 *mai* 1882, *p.* 332.

DOGIEL. — Beiträge zur Lehre von der Arsenwirkung auf den tieri schen Organismus. — *Pflüger's Arch.* 24, p. 328.
BIRCH-HIRSCHFELD. — d'après BIERNACKI: Ueber die angebliche Blutbildende Wirkung des Arseniks. — *Wiener Med. Wochenschr.* 1904. 25, 26, 27.
12. J. CHERON. — *Centralblatt f. innere Mediz.* 1896 p. 186. —
13. LÉVY-BING, DUROEUX et M. DOGNY. — Étude du sang chez les syphilitiques traités par le salvarsan. — *Annales des maladies vénériennes, Mai* 1912, No. 5. —

ISTITUTO DI FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E TERAPIA
DELLA R. U. DI MESSINA.
(Direttore: G. VINCI).

Sull' avvelenamento per Carlian gummifera.
Nota IV. — Ricerche chimiche e farmacologiche sopra alcuni sali e sui prodotti di scissione dell' acido atractylico e loro azione in rapporto alla costituzione chimica

PER

LUIGI TOCCO
Aiuto

Studiata l'azione che il principio tossico della Carlina g. — l'atractylato di potassio — esercita sull' organismo, ho creduto interessante estendere le ricerche ad altri sali ed ai prodotti di scissione dell' acido atractylico. Le modificazioni, che si sarebbero presentate nell' azione biologica mano mano che si asportano i diversi radicali dalla molecola, mi avrebbero permesso di portare un contributo alla conoscenza della relazione che esiste fra costituzione chimica ed azione biologica di queste sostanze.

Per queste ricerche si presta molto bene l'atractylato di K il quale ha una molecola che, con mezzi adatti, si scinde facilmente nei suoi componenti.

Ho fatto questa scissione in parte seguendo i metodi da altri indicati, in parte modificandoli o creandone dei nuovi dove mi è sembrato necessario, ed ho studiato i prodotti ottenuti sperimentandoli sui diversi animali di laboratorio.

Siccome nessuno autore, che si è occupato di questo argomento, ha dato un riassunto delle nostre conoscenze chimiche sui sali e sui derivati dell' acido atractylico, faccio precedere ogni capitolo da un cenno sulla preparazione e sui caratteri di queste sostanze.

Acido atractylico.

Si prepara quest'acido trattando con una corrente di acido solfidrico gassoso l'atractylato di piombo basico, composto insolubile che si ottiene precipitando una soluzione di atractylato di potassio con il sotto-acetato di piombo.

Evaporando nel vuoto la soluzione filtrata, la quale è incolora, inodora, di sapore acidissimo, astringente e nello stesso tempo amaro e dolcigno, residua un prodotto di consistenza grassa, l'acido atractylico, che si altera rapidamente sprigionando odore di acido valerianico e mettendo in libertà acido solforico.

A caldo si scompone più presto dando oltre acido valerianico e solforico, uno zucchero e una sostanza resinosa.

L'acido atractylico, che secondo LEFRANC avrebbe la formula $S^4O^{12}C^{60}H^{52}O^{20}3HO$, dà tre serie di sali:

I serie tribasica : $3RO.A$.
II » bibasica : $(2RO + HO).A$.
III » monobasica : $(RO + 2HO).A$.

ATRACTYLATI.

A. *Bibasici*—$(2RO + HO)\,A$. — A questa serie appartiene l'atractylato di potassio che si estrae dalla radice della Carlina.

Questi atractylati bibasici si possono facilmente preparare per doppia decomposizione, versando in una soluzione di atractylato di bario bibasico un solfato solubile del sale che si desidera sinchè non si forma più precipitato. Questi sali cristallizzano facilmente.

La preparazione del sale base, atractylato di bario, si fa mescolando delle soluzioni sature e bollenti di atractylato di potassio e di $BaCl^2$ in eccesso. Immediatamente dopo si forma una massa cremosa è dopo 12 ore si raccoglie sopra un filtro il precipitato che è costituito da cristalli aghiformi d'una grande sottigliezza raggruppati a forma di stella, di colore bianco-madraperlaceo, di leggerezza simile a quella del solfato di chinina. L'atractylato di bario cosi ottenuto per precipitazione, lo si comprime tra carta da filtro e con una o due cristallizzazioni, da una soluzione idro-alcoolica satura alla temperatura di ebollizione, si ottiene puro.

Atractylato di potassio—Estrazione. — LEFRANC ha preparato per il primo questo sale bibasico estraendolo dalla radice a mezzo di solventi neutri.

Della stessa tecnica, modificata opportunamente, si è servito ANGELICO.

Si fa il decotto per circa 20', 25' della radice secca e polverizzata. Raffreddato il liquido e lasciato per 24 ore a riposo, si separa l'inulina precipitata, filtrando su panno di lana. Si evapora il filtrato fino a consistenza di estratto sciropposo, si riprende con alcool a 85°, in quantità tale però che la soluzione idro-alcoolica non venga ulteriormente intorbidata da un eccesso di alcool. Dopo circa 12 ore si decanta in modo da separare il precipitato bruno gommoso, che si è determinato con questo trattamento alcoolico. Distillando l'alcool si ottiene un liquido bruno, di odore aromatico speciale, di sapore un pò acro zuccherino, di consistenza sciropposa che abbandonato a se stesso per 5 giorni lascia precipitare, sotto forma cristallina, la quasi totalità dell'atractylato disciolto. Alcune soluzioni e cristallizzazioni nell'alcool a 56° bollente, con trattamento di carbone animale ben lavato, permettono di ottenerlo allo stato di purità. Se il carbone animale però è impuro, si produce una certa quantità di atractylato doppio di potassio e di calcio che è difficile separare dal primo, perchè non cristallizza da l'acqua.

Siccome è possibile estrarre con trattamento diretto con alcool a 75° l'atractylato di potassio dalla radice, e questa dà pure direttamente le reazioni dell'atractylato di potassio, è da ritenersi che questo sale si trova preformato nella radice della Carlina gummifera e non è un prodotto di trasformazione che si origina durante l'estrazione.

Caratteri fisici e chimici. — L'atractylato di potassio è una sostanza di colorito appena giallastro, cristallizzata in piccoli aghi prismatici, corti e sottili, dotati del fenomeno della doppia rifrazione, levogiri, con un potere rotatorio di 5°,77, inodori, di un sapore amaro speciale, leggermente zuccherino e astringente, che ricorda lontanamente la droga da cui provengono.

È solubile nell'acqua calda nella proporzione del 2 %, formando una soluzione leggermente opalescente, di reazione spiccatamente acida; nell' alcool debole più a caldo che a freddo, quasi insolubile in etere, cloroformio e acetone.

Si può riscaldare sino a 120° senza che si modifichi, a 160° circa annerisce, si rigonfia ed emana dei vapori di acido valerianico e piccola quantità di un vapore di colore rossastro, che si condensa poi in un liquido dello stesso colore. Innalzando ancora la temperatura spande dei vapori fuligginosi, acidi, di odore nauseante, molto infiammabili che bruciano con fiamma molto luminosa.

Calcinato lascia un residuo di solfato di potassio del 20,80 %.

La soluzione acquosa del sale non precipita con cloruro di bario, se non è molto concentrata : solo allora si ha un precipitato caseoso cristallino di atractylato di barite, il quale è solubile in un eccesso di acqua distillata o per aggiunta di qualche goccia di acido acetico o cloridrico.

Col nitrato d'argento dà un sale pochissimo stabile.

L'atractylato di potassio trattato con acido solforico concentrato emana odore di acido valerianico e si forma un liquido di colore rosso-bruno, che lasciato all'aria o per aggiunta di acqua, diventa rapidamente violetto (LEFRANC).

Con acido solforico contenente traccie di una soluzione acquosa molto diluita di formaldeide, dà una colorazione azzurro-violacea per aggiunta di acqua (ANGELICO).

Con acido solforico e una soluzione acquosa di vanillina o di piperonalio, si colora in rosso fucsina (ANGELICO).

Con una soluzione acquosa di aldeide protocatecica ed acido solforico si colora in rosso solferino (TOCCO).

Formula. — Secondo LEFRANC l'atractylato di potassio ha la formula $S^4O^{12}C^{60}H^{52}O^{20}$ 2KO + HO.

Egli l'ottenne stabilendo l'equivalente dell'acido atractylico dai dati dell'analisi dell'atractylato tribasico di potassio, di barite e d'argento combinati con quelli dell'analisi elementare dell'atractylato di potassio.

Secondo ANGELICO la formula sarebbe $C^{30}H^{52}K^2S^2O^{18}$. Questa formula però, va riferita al sale seccato all'aria, giacchè, secondo lui, non si riesce a metterlo a peso costante nel vuoto in acido solforico.

Azione farmacologica. — Vedi nota II in questo Archivio. XXVI, 1922.

A. tribasici—3RO.A. — Si ottiene facilmente un sale della serie tribasica riscaldando una soluzione acquosa di un sale della serie bibasica con un carbonato del sale che si desidera.

La maggior parte di questi sali della prima serie non cristallizzano dall'acqua, ma vi restano allo stato gelatinoso. Cristallizzano invece molto bene da soluzioni idro-alcooliche (alcool da 56° a 75°) sature alla temperatura di ebollizione.

Con grande economia di tempo si possono preparare questi sali allo stato cristallino saturando a caldo soluzioni idro-alcooliche sature del sale generatore col carbonato del sale relativo.

Nel caso invece dell'atractylato di bario, questa saturazione non deve essere fatta con carbonato, ma con l'idrato di bario da aggiungersi a poco a poco, finchè la soluzione idro-alcoolica dell'atractylato di bario della serie bibasica reagisce neutra alle carte reattive. Per raffreddamento il nuovo sale precipita immediatamente allo stato cristallino.

A. monobasici — (RO + 2HO). A. — Questi sali si possono ottenere solamente in soluzione diluita perchè, quando hanno raggiunto un certo grado di concentrazione, tendono a scindersi in un sale della serie bibasica, che è poco solubile e precipita cristallizzato, e in acido atractylico libero, molto solubile che resta nella soluzione acquosa.

E' da notarsi che questa scissione non avviene solamente cogli atractylati della serie monobasica ; anche quelli tribasici subiscono la stessa sorte in determinate condizioni.

Così una soluzione di atractylato di potassio tribasico, se viene trattato con acido tartarico o con tartrato acido di potassio, o con acido ossalico, passa facilmente allo stato di atractylato bibasico, che cristallizza facilmente.

Questa reazione è cosi sensibile che, secondo LEFRANC, potrebbe essere utilizzata in chimica analitica come un ottimo reattivo dei sali di potassio.

Caratteri generali degli atractylati. — Gli atractylati sono solubili nell'acqua e nell'alcool diluito più a caldo che a freddo: il loro miglior solvente è l'alcool a 56° bollente, dal quale si possono ottenere molto bene cristallizzati. I sali tribasici sono più solubili dei bibasici ed hanno un sapore amaro molto più accentuato. Le soluzioni acquose di questi sali resistono bene all'ebollizione, eccettuate le soluzioni di quelli, le cui basi possono ridursi, come l'atractylato d'argento e di rame.

Gli atractylati non contengono acqua di cristallizzazione; resistono bene al calore, tanto che si possono essiccare alla temperatura di 100°—105° senza che si alterino. Innalzando ancora la temperatura gli atractylati tribasici sono quelli che maggiormente resistono colorandosi appena in grigio a 160°, mentre alla stessa temperatura i bibasici si rigonfiano, carbonizzano e si scindono in acido valerianico e solforico.

Bruciati, spandono dei vapori acidi con forte odore di acido valerianico che s'infiammano facilmente con fiamma fuligginosa molto luminosa.

Calcinati, gli atractylati alcalino-terrosi lasciano un residuo, gli altri, tracce di solfuri.

Trattati con acido solforico concentrato spandono odore di acido valerianico e si colorano in violacco allo stesso modo dell'atractylato naturale, giacchè l'instabilità dell'acido atractylico e la facilità con cui gli acidi forti lo scindono, fanno si che le reazioni, che sono proprie a quest'acido, lo siano pure a questi sali.

RICERCHE FARMACOLOGICHE SUGLI ATRACTYLATI.

La grande difficoltà di avere dello atractylato di potassio in quantità, mi ha costretto a limitare questa serie di ricerche a tre soli sali bibasici dell'acido atractylico e precisamente agli atractylati di bario, magnesio, e sodio. Ho preparato l'atractylato di bario, seguendo esattamente il metodo di LEFRANC con piccole modificazioni solo nella purificazione del sale, che ho cristallizzato diverse volte dall'alcool a 70° bollente. Per ottenere i sali di magnesio e sodio sono partito dall'atractylato di Ba versando sopra una soluzione di questo sale, in acqua distillata e bollente, nella proporzione 1 : 10, una soluzione bollente di ugual peso di solfato di sodio o di magnesio

sciolto nella stessa quantità di acqua, Si filtra il liquido per liberarlo dal solfato di bario precipitato, si concentra a bagno-maria fin quasi a secchezza : il residuo secco raccolto su filtro, compresso e asciugato viene purificato per successive cristallizzazioni dall'alcool acquoso bollente. Di questi sali quello di magnesio è il più solubile, poi in ordine di solubilità vengono quello di potassio e sodio, quello di bario è quasi insolubile.

Esperienze. — Ho sperimentato sopra piccioni, cavie e piccoli conigli, usando i sali di sodio e magnesio in soluzione acquosa, quello di bario in sospensione acquosa ottenuta triturando finemente in mortaio di quarzo fino a polvere impalpabile, sempre per via ipodermica a dosi uguali a quelle adoperate per l'atractylato di potassio (cgr. 20-30 per Kg.).

Azione tossica. — Questi atractylati sono letali per tutti gli animali da esperimento. Il quadro di intossicazione però non è lo stesso.

Col sale di sodio si ha presso a poco la sintomatologia di quello di potassio, solo il rigurgito, la dispnea e le convulsioni nei piccioni, la dispnea e le convulsioni negli altri animali, durano meno a lungo e sono meno intense.

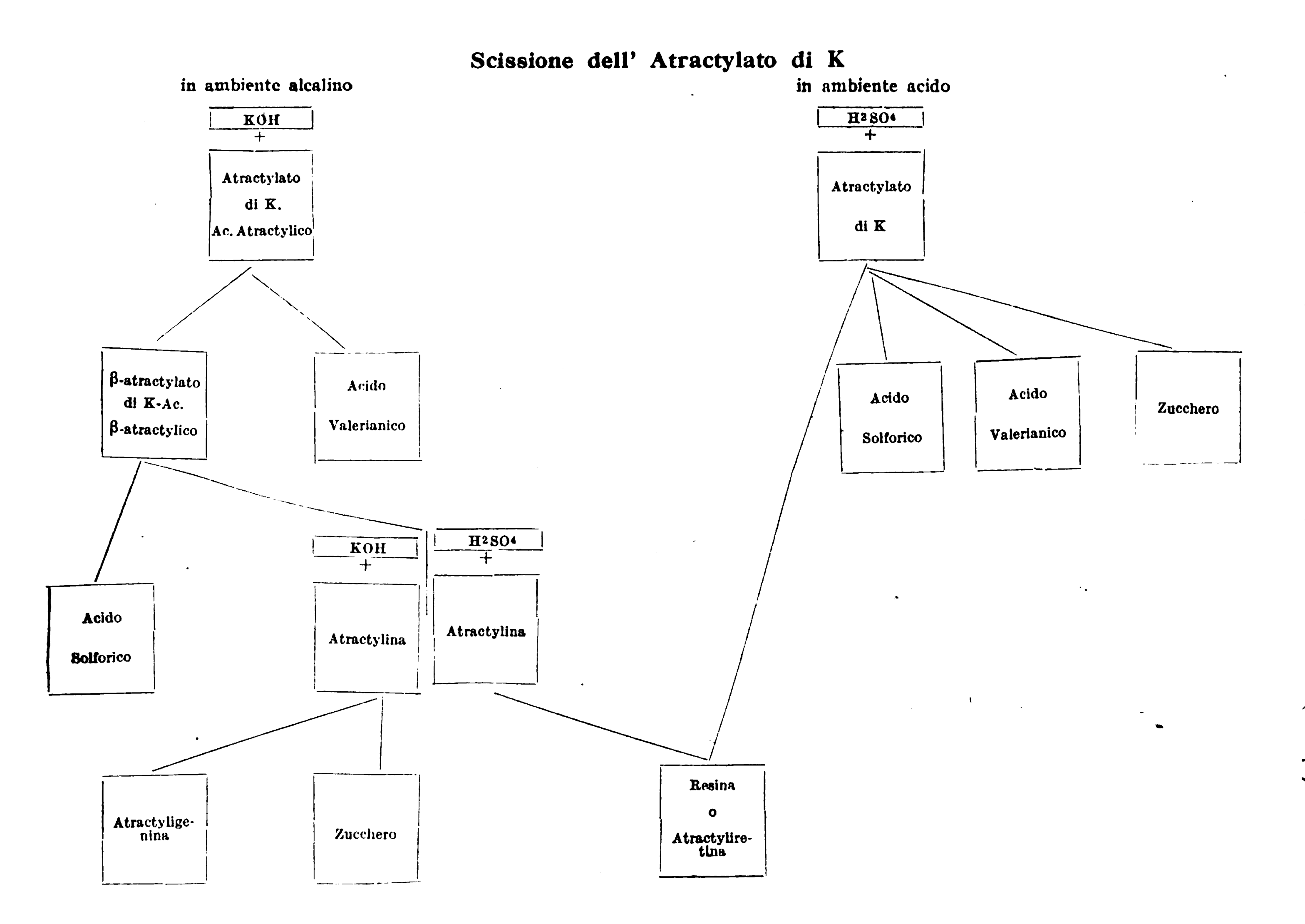
Gli animali invece intossicati con sali di magnesio e bario muoiono senza presentare nè dispnea nè convulsioni: così quelli avvelenati con sale di magnesio si mostrano prima un pò eccitati, poi si accantucciano o fanno qualche passo disordinato finchè muoiono ; quelli avvelenati con sale di bario poco dopo l'iniezione presentano gli arti fortemente distesi e le ali addossate al torace, messi sul dorso non possono girarsi, rimangono immobili per tutta la durata dell'avvelenamento e solo poco tempo prima di morire presentano movimenti disordinati del capo. Di regola il respiro si arresta prima del cuore.

Assorbimento — Eliminazione. — L'assorbimento di questi sali è rapidissimo. L'eliminazione s'inizia prestissimo, tanto che è possibile metterli in evidenza negli escrementi dei piccioni e nelle urine delle cavie e dei conigli con aldeide protocatecica e acido solforico da 3 a 5 minuti dopo la somministrazione.

Diffusione negli organi. — Per la ricerca di questi sali negli organi e nei liquidi dell'organismo ho usato la stessa tecnica adoperata per la ricerca dell'atractylato di potassio (vedi nota II).

Come il sale di potassio, questi sali si riscontrano in tutti gli organi e i liquidi dell'organismo, a preferenza però negli organi escretori e nei loro prodotti di escrezione (bile, urina, etc.).

***


Scissione dell' Atractylato di K
in ambiente alcalino
KOH
+
Atractylato di K. Ac. Atractylico
β-atractylato di K-Ac. β-atractylico
Acido Valerianico
Acido Solforico
KOH
+
Atractylina
H²SO⁴
+
Atractylina
Atractyligenina
Zucchero
Resina o Atractyliretina
in ambiente acido
H²SO⁴
+
Atractylato di K
Acido Solforico
Acido Valerianico
Zucchero

Scissione dell'Atractylato di Potassio.

L'atractylato di K trattato a b. m. con un acido diluito si scinde in acido solforico, acido valerianico, uno zucchero e atractyliretina ; bollito con un alcale dà acido valerianico e acido β-atractylico, il quale a sua volta si sdoppia in acido solforico e atractylina.

L'atractylina con un acido diluito si scinde in atractyliretina, con un alcali in atractyligenina e uno zucchero.

Raggruppo, in forma schematica, queste scissioni nel quadro a pagina 427.

A. — Prodotti di Scissione dell'atractylato di potassio in ambiente acido.

Lefranc fu il primo a riconoscere che se si tratta una soluzione acquosa di atractylato di potassio con acido cloridrico a b. m. si spande odore di acido valerianico molto pronunziato, la soluzione con cloruro di bario dà un precipitato per acido solforico messosi in libertà, e riduce il Felhing.

In progresso di tempo la soluzione s'intorbida, e finisce col depositarsi una sostanza gommosa che Lefranc chiamò *Atractyliretina.*

In complesso dunque, per azione dell'acido cloridrico a b. m., la molecola dell'atractylato di potassio si scinde in bisolfato di potassio, acido valerianico, in un glucosio capace di ridurre il Felhing e di fermentare, e in atractyliretina.

Questa scissione è già manifesta dopo pochi minuti di ebollizione, ma è necessario non meno di due o tre ore perchè una soluzione di 10 gr. di atractylato di potassio sia completamente scissa.

Anche cogli acidi solforico, nitrico, acqua regia, dopo trattamento per parecchie ore, si ha scissione della molecola nei prodotti sopradetti, resiste ad essi la sostanza gommosa che è precipitata immodificata per semplice aggiunta di acqua.

Questa gomma ha un sapore amaro molto pronunziato, è solida alla temperatura ordinaria, si rammollisce fra le dita, di più nell'acqua bollente, ma è insolubile nell'acqua.

E' solubilissima nell'alcool, nell'etere, negli acidi grassi, acetico e valerianico, dai quali tuttavia per aggiunta di acqua precipita sotto forma di emulsione; è pure solubile in ambiente alcalino, donde precipita per acidificazione.

Lefranc richiamò l'attenzione sul fatto che le proprietà di questa gomma sono simili a quelle della sostanza vischiosa, che abbonda, allo stato di emulsione di un color bianco latteo, nella radice della

Carlina e che forma delle concrezioni attorno al capolino e nella parte inferiore della radice, quando la pianta si avvicina alla fine della sua vegetazione.

Però mentre da questo lattice si può estrarre del caucciù, finora tutti i tentativi fatti da noi a questo scopo, su questa sostanza gommosa, andarono falliti.

ANGELICO, che nel 1906 ne riprese lo studio, ottenne, come LEFRANC, dall'atractylato di K per azione di acido solforico e cloridrico diluiti a caldo, oltre i soliti prodotti di scissione: acido solforico, valerianico, ed un idrato di carbonio, una sostanza facilmente fusibile, che per raffreddamento solidifica. Questa sostanza ha carattere acido, tanto che si scioglie determinando effervescenza nei carbonati alcalini, e da questa soluzione viene precipitata dagli acidi. Straordinariamente solubile nell'alcool etilico e metilico, è, secondo ANGELICO, quasi insolubile nell'acqua, insolubile del tutto nell'etere e nei solventi anidri. Sciolta in poco alcool e precipitata con acqua, presenta tutti i caratteri di un colloide, aderisce fortemente alle pareti del recipiente tanto allo stato secco che umido.

RICERCHE FARMACOLOGICHE SUL PRODOTTO DI SCISSIONE DELL'ATRACTYLATO DI POTASSIO IN AMBIENTE ACIDO (ATRACTYLIRETINA).

Preparazione. — Per preparare questa gomma o resina, sono partito dall'atractylato di potassio trattando una soluzione di 10 gr. di esso in acqua distillata bollente con acido solforico diluito fino a reazione fortemente acida, e in apparecchio a ricadere per oltre tre ore, finchè il filtrato, portato nuovamente ad ebollizione non s'intorbidava più. I fenomeni della scissione si possono avvertire pochi minuti dopo l'aggiunta dell'acido solforico, poichè si sprigiona odore di acido valerianico, il liquido diventa opalescente e si libera una sostanza resinosa, che tende a raggrumarsi sulle pareti del recipiente.

Lavandola con acqua e poi ripetutamente con etere, poichè trattiene con grande tenacia tracce di acido valerianico, ho ottenuto una sostanza gommosa di colorito appena giallastro, solida alla temperatura ordinaria, che si rammollisce fra le dita e in acqua calda ; solubile nell'alcool e nell'acqua alcalinizzata con potassa, che presenta le stesse reazioni dell'atractylato di potassio—l'atractyliretina.

Esperienze. — Ho sperimentato su piccioni, conigli e cavie, iniettando sotto cute la sostanza per la sua insolubilita in acqua, sia in sospensione, che in soluzione acquosa alcalinizzata. La sospensione veniva preparata triturandone in mortaio d'agata una determinata quantità (cgr. 30-50 per Kg.) finchè si formava una polvere impalpabile, e aggiungendo poi acqua goccia a goccia fino al volume stabilito

(5 cc.). Si aspirava con una siringa munita di ago da calomelano e rapidamente s'iniettava. Per ottenere la soluzione, una quantità determinata (cgr. 30-50 per Kg.) di questa sostanza veniva con una traccia di soluzione alcoolica di fenoftaleina, finemente triturata in mortaio d'agata fino a diventare polvere impalpabile, si aggiungeva, sempre agitando, una soluzione decimo normale di idrato di soda, finchè il liquido diventava limpido ed assumeva una colorazione leggermente rossa, e si portava con acqua distillata a cc. 5.

Tossicità. — Questa resina iniettata in sospensione o in soluzione alcalina non è mortale, anche a forti dosi, per i comuni animali da esperimento. Tanto i piccioni che i conigli e le cavie subito dopo l'iniezione si mostrano leggermente eccitati, hanno diuresi e talvolta diarrea, ma dopo qualche giorno si rimettono completamente.

Azione locale. — Nel posto dell'iniezione, poco tempo dopo, si forma una tumefazione edematosa, intensa da potere infossare un dito. La cute tutt'intorno è pavonazza, ipertermica e la pressione suscita vivo dolore. Dopo circa 24 ore la tumefazione scompare e si forma nella parte centrale di essa una piccola escara necrotica della grandezza d'una moneta di 5 centesimi, che dopo qualche giorno cade.

Assorbimento — eliminazione — diffusione. — Siccome l'atractyliretina presenta le stesse reazioni dell'atractylato di potassio, per rivelarla nelle escrezioni e nei diversi organi mi sono servito della reazione con aldeide protocatecica e acido solforico seguendo la tecnica altrove indicata. L'assorbimento è rapidissimo: è possibile constatarne la presenza negli escrementi dei piccioni da 5 a 10 minuti dopo la somministrazione. L'eliminazione dura abbastanza a lungo; raramente oltre le 24 ore.

Si riscontra in tutti gli organi e i liquidi dell'organismo, in maggiore quantità però negli organi escretori e nei loro prodotti di escrezione (urina, bile, rene, intestino, fegato, ecc.).

B. — Prodotti di scissione dell'atractylato di potassio in ambiente alcalino.

L'acido atractylico, o i suoi sali, trattati con soluzione alcalina si sdoppiano in acido valerianico e in acido β-atractylico, il quale, a sua volta, si scinde in acido solforico e in una sostanza speciale da Lefranc chiamata *atractylina*. Questa con acido solforico o cloridrico allungato, si disidrata e si scinde fornendo una sostanza resinosa, giallastra, insolubile nell'acqua, la quale per Lefranc sarebbe identica alla gomma o resina che si ottiene trattando lo atractylato di potassio con un acido forte all'ebollizione, — alla atractyliretina. Trattando invece l'atractylina con una soluzione alcalina diluita si scinde in atractyligenina e uno zucchero.

ACIDO β-ATRACTYLICO. β-ATRACTYLATI.

Preparazione. — Il punto di partenza obbligato per la preparazione di questi β-atractylàti è il β-atractylato di bario, che si ottiene sciogliendo l'atractylato di bario in acqua di barite e saponificandolo all'ebollizione per un minuto. Si sospende l'operazione quando il liquido diventa torbido. Si lascia raffreddare e si precipita l'eccesso di barite con una corrente di anidride di carbonio: si ottiene un liquido che contiene del valerianato di barite e del β-atractylato tribasico di bario. Concentrando non tarda a formarsi una massa cristallina, perchè, a differenza dell'atractylato di barite, il β-atractylato cristallizza dall'acqua. Raccolto e asciugato questo sale, si scioglie in acqua e si precipita acidificando la soluzione con acido cloridrico diluito: si ha così un β-atractylato acido simile all'atractylato di potassio naturale. Siccome questo sale è solubile in acqua, esso può dare, per doppia decomposizione coi solfati alcalini, i β-atractylati corrispondenti.

Caratteri generali. — Questi sali hanno su per giù gli stessi caratteri dei corrispettivi atractylati, ma se ne differenziano facilmente perchè sono più solubili in acqua e in alcool, cristallizzano più facilmente e non contengono acido valerianico.

RICERCHE FARMACOLOGICHE COI β-ATRACTYLATI DI K, NA, MG, BA.

Per ottenere questi sali ho seguito il metodo di LEFRANC sopradetto per la preparazione del β-atractylato di Ba, dal quale, per doppia decomposizione coi solfati di potassio, magnesio e sodio, ho poi ottenuti i β-atractylati corrispondenti.

Esperienze. — Sono stato costretto a limitare le mie ricerche a quattro sali dell'acido β-atractylico e precisamente a quelli di potassio, sodio, magnesio e bario per la difficoltà già espressa di non avere dell'atractylato di potassio in grande quantità. Essendo i sali di sodio, potassio e magnesio solubilissimi in acqua, li ho perciò usati per via ipodermica in soluzioni acquose a dosi alquanto minori di quelle letali dell'atractylato di potassio.

Il sale di bario, essendo poco solubile, fu adoperato in sospensione acquosa ad uguale dose e per la stessa via. Credo non ovvio notare che, pur essendo le dosi dei β-atractylati adoperati minori di quelle degli atractylati, tuttavia sono effettivamente quasi uguali perchè nella molecola dei β-atractylati manca l'acido valerianico.

Questi sali sono tutti letali per gli animali da esperimento adoperati (piccioni, cavie, piccoli conigli) e l'avvelenamento decorre colla stessa sintomatologia degli atractylati corrispondenti. Quelli avve-

lenati coi β-atractylati di potassio e sodio, dopo 2 a 5 ore dalla somministrazione del farmaco, presentano dispnea intensa e convulsioni tonico-cloniche, che sono meno intense e di minore durata in quelli avvelenati col sale di sodio. Nei piccioni si nota rigurgito ostinato. La morte avviene durante un accesso convulsivo, per arresto del respiro e poi del cuore, più presto che negli animali avvelenati cogli atractylati.

Negli animali invece intossicati con i sali di magnesio e bario mancano i fenomeni convulsivi: quelli trattati con sale di magnesio, dopo 4 o 6 ore dalla somministrazione del farmaco, si mostrano molto agitati, con vertigini, cammino disordinato, in seguito si abbattono sul terreno e, non si muovono, se non eccitati, fino alla morte; quelli avvelenati col sale di bario hanno gli arti inferiori distesi e le ali addossate al tronco, solo il capo è libero nei suoi movimenti. L'animale muore in questa posizione, per arresto del respiro e poi del cuore, in minor tempo dei piccioni avvelenati coll'atractylato corrispondente.

Assorbimento — eliminazione. — diffusione. — Siccome i β-atractylati hanno le stesse reazioni di colore degli atractylati, così ne ho studiato la eliminazione rintracciandoli nelle urine e nei liquidi dell'organismo con la reazione più volte citata.

L'assorbimento di questi sali è rapido, com'è pronta l'eliminazione. Nelle urine si possono mettere in evidenza da 5 a 10 minuti dopo la somministrazione. L'eliminazione non dura oltre le 24 ore. Una parte viene eliminata con le feci.

I β-atractylati, si diffondono in tutti gli organi e i liquidi dell'organismo, si rinvengono però in maggior copia negli organi escretori (rene, fegato).

Atractylina.

E' difficile ottenere questa sostanza completamente priva di atractyligenina.

Secondo Lefranc, è necessario partire da un β-atractylato, giacchè, se si parte da un atractylato non è possibile separarla dall'acido valerianico per il quale ha grande affinità. Si prepara trattando all'ebollizione per 10 minuti un dato peso di β-atractylato di potassio con un uguale peso di idrato di potassa sciolto in 30 parti di acqua. Il liquido risultante è composto di solfato di potassio e atractylina alcalina che, per aggiunta di acido cloridrico e di soluzione satura di cloruro di sodio, si separa sotto forma di fiocchi biancastri. Viene purificata lavandola con etere e in seguito precipitandola a diverse riprese da una soluzione alcoolica con un eccesso di etere. Essa tuttavia contiene ancora dell'atractyligenina, dalla quale è possibile separarla, secondo Lefranc, a questo modo: nel procedimento sopra descritto prima di aggiungere il NaCl alla soluzione acida per acido cloridrico,

si agita la soluzione con cloroformio, che trattiene l'atractyligenina, e forma con essa una emulsione come quella che l'acqua di calce fa con l'olio.

Versata questa massa sopra un filtro, l'acqua e il cloroformio scolano lasciando sul filtro un deposito bianco d'actractyligenina pura insolubile nell'acqua.

Caratteri fisico-chimici. — L'atractylina si presenta come una sostanza solida, inodora, di colore biancastro, di aspetto gommoso, di sapore intensamente zuccherino, solubile nell'acqua e nell'alcool, insolubile nell'etere, di reazione leggermente acida.

Forma con le basi alcalino-terrose delle combinazioni molto solubili nell'acqua, ma alterabili all'ebollizione prolungata. Bruciata su lastra di platino oltre 100° carbonizza, poi si rigonfia spandendo dei vapori biancastri irritanti. Con l'acido solforico presenta le stesse reazioni dell'atractylato, con acido nitrico a caldo dà un prodotto xanto-proteico.

RICERCHE FARMACOLOGICHE SULL'ATRACTYLINA.

Preparazione. — La preparazione dell'atractylina riesce alquanto difficile e richiede molta attenzione, perchè, data la poca stabilità di questa sostanza, facilmente si scinde in atractyligenina. Invece che dal β-atractylato di potassio, come consiglia LEFRANC, io sono partito dal β-atractylato di bario, trattandolo all'ebollizione per 10 minuti con parti uguali di idrato di potassio sciolto in 30 parti di acqua. Precipita il solfato di bario e nel liquido si trova l'atractylina allo stato di combinazione alcalina. Si filtra e al liquido filtrato si aggiunge acido cloridrico fino a leggero eccesso e poi cloruro di sodio fino a saturazione. Agitando il liquido l'atractylina si separa e si raccoglie alla superficie in massa fioccosa.

Con questo metodo, consigliato da LEFRANC e da me modificato, non è possibile ottenere tutta l'atractylina contenuta nelle acque madri, il che per me era di somma importanza, date le esigue quantità di sostanza su cui lavorava

Ho potuto ovviare a questo inconveniente in questo modo: alla soluzione satura per cloruro di sodio si aggiunge una piccola quantità di etere e si agita fortemente. Essendo l'atractylina insolubile in etere, questa viene più facilmente spostata dalla soluzione salina, dall'emulsione che si forma tra questa e l'etere.

Lasciando in riposo, l'atractylina si raccoglie nel punto di contatto dei due liquidi come piccoli grumi. Si filtra e il residuo viene lavato in etere e poi sciolto in alcool, dal quale si può ottenere l'atractylina allo stato quasi puro precipitandola per diverse volte con un eccesso di etere.

Non mi sono preoccupato che l'atractylina così preparata può contenere piccole tracce di atractyligenina, poichè le esperienze, fatte su quest'ultima sostanza, mi avevano dimostrato che essa è completamente inattiva sugli animali da esperimento.

Tossicità. — L'atractylina è solubile in acqua, ma si altera rapidamente: perciò nelle esperienze ho sempre adoperato soluzione preparata da recente somministrandola per via ipodermica.

Essa, già alla stessa dose dell'atractylato di potassio, è letale per i comuni animali da esperimento.

Il quadro dell'avvelenamento esplode tardi, dalle 4 alle 6 ore, secondo le dosi.

L'animale comincia a mostrarsi leggermente eccitato, in seguito però resta immobile e muore senza presentare convulsioni e dispnea. Se invece si somministra una soluzione preparata da oltre 24 ore, l'animale non presenta nessun sintomo d'avvelenamento e non muore anche per dosi di cgr. 65 per Kg.

Azione locale. — Nel posto dove si pratica l'iniezione si forma una bozza edematosa e la cute tutt'intorno si presenta infiammata. Negli animali che non vengono a morte, perchè s'inietta una soluzione preparata da oltre 24 ore, dopo qualche giorno, nel posto della iniezione si forma una escara necrotica della grandezza d'una moneta di cinque franchi, che dopo il sesto giorno cade.

Assorbimento — eliminazione. — diffusione. — Questa sostanza viene rapidamente assorbita e prontamente eliminata, tanto che è possibile rintracciarla, colla stessa reazione dell'atractylato di K, nelle urine degli animali e negli escrementi dei piccioni da 3 a 10 minuti dopo la somministrazione del farmaco. Nulla posso dire sulla durata dell'eliminazione negli animali iniettati con soluzione preparata da recente, perchè tutti andarono a morte, in quelli iniettati con soluzione preparata da tempo, l'eliminazione è durata oltre le 24 ore.

Per la ricerca negli organi mi sono servito della tecnica più volte citata.

Questa sostanza si trova in tutti gli organi e i liquidi dell'organismo degli animali avvelenati: negli organi escretori in maggiore quantità.

ATRACTYLIGENINA.

E' questo il prodotto di scissione finale, che si ottiene assieme ad un valerianato, un solfato e uno zucchero, quando si tratta l'acido atractylico, o un suo sale, con soluzione di potassa forte a caldo.

Caratteri. — Si presenta come una sostanza cristallizzata, di colorito biancastro, di sapore fortemente dolce, insolubile nell'acqua,

solubilissima nell'alcool e nell'etere. Scaldata con precauzione su lamina di platino sopra 100° fonde in una massa vetrosa limpida, in seguito sublima inalterata sotto forma di vapori biancastri di odore irritante, simili a quelli che si sprigionano quando si riscalda l'atractylina.

RICERCHE FARMACOLOGICHE SULL'ATRACTYLIGENINA.

Preparazione. — Data la scarsa quantità di sostanza di cui disponevo ed essendo l'atractyligenina l'ultimo prodotto di scissione dell'atractylato, ho preparato questa sostanza facendo bollire a ricadere un dato peso di atractylato di potassio con un ugual peso di soda caustica sciolti in 30 volumi di acqua, per acidificatione si separa un prodotto lattiginoso che poi cristallizza, raccolto su filtro, chiarificato con carbone animale, purificato con successive cristallizzazioni, sciolto in alcool e riprecipitato con acqua, dà un prodotto puro cristallizzato, di sapore intensamente dolce, che presenta tutti i caratteri dati da LEFRANC per l'atractyligenina.

Con questo prodotto ho istituito due serie di esperienze su uccellini, piccioni, cavie e conigli usandolo sempre per via ipodermica.

In una prima serie ho usato l'atractyligenina in sospensione nell'acqua, in una seconda serie in soluzione acquosa alcalina a dosi di gr. 0,50—0,60 per Kg. di animale, seguendo esattamente la tecnica esposta per l'atractyliretina.

Azione tossica. — L'atractyligenina, iniettata in sospensione o in soluzione alcalina, non è tossica per i comuni animali da esperimento, nè determina fenomeni d'infiammazione nel posto dov'è iniettata. Tutti gli animali tollerano forti dosi di questa sostanza senza presentare alcuna sintomatologia.

Assorbimento — eliminazione. — diffusione. — L'assorbimento avviene rapidissimo quando questa sostanza è iniettata in soluzione alcalina, un pò più lentamente quando è iniettata in sospensione. E' possibile svelarla nelle urine dei conigli e delle cavie, e negli escrementi dei piccioni, da 5 a 10 minuti dopo la iniezione per mezzo della stessa reazione usata per l'atractylato di K, la quale è comune a questa sostanza.

L'eliminazione dura a lungo, mai oltre le 24 ore.

L'atractyligenina venne riscontrata in tutti gli organi e liquidi dell'organismo.

* * *

Riassumo l'azione farmacologica che presentano i sali ed i prodotti di scissione dell'ac. atractylico nella seguente tavola :

ACIDO ATRACTYLICO

(acido solforico + acido valerianico + zucchero + { atractyligenina o atractyliretina })

Sali (Solubili in H2o)

Atractylato di Potassio	— Letale. — Azione convulsivante a sede bulbo-cerebrale e dispnea intensa. — D. T. nel piccione cg. 20-25 per kg. sotto cute.
Atractylato di Sodio	— Letale. — Azione convulsivante meno intensa del sale di K, dispnea meno accentuata. — D. T. nel piccione cg. 20-30 per kg. s. c.
Atractylato di Magnesio	— Letale. — Gli animali muoiono senza convulsioni e senza dispnea. — D. T. nel piccione cg. 20-30 per kg. s. c.
Atractylato di Bario	— Letale. — Gli animali muoiono coi muscoli in contrazione tonica, senza presentare dispnea. — D. T. nel piccione cg. 20-30 per kg. s. c.

Prodotti di scissione in ambiente

acido

Atractyliretina: Insolubile in acqua. Non letale. Azione irritante locale.

alcalino

β-Atractylati (H^2SO^4 + atractylina + zucchero) (solubilissimi in H^2O)

β-Atractylato di Potassio	— Letale. — Azione convulsivante e dispnea intensa. — D. T. nel piccione cg. 20 per kg. sotto cute.
β-Atractylato di Sodio	— Letale. — Azione convulsivante e dispnea meno intensa del sale di K. — D. T. nel piccione cg. 20 per kg. s. c.
β-Atractylato di Magnesio	— Letale. — Il piccione muore senza convulsioni e senza dispnea. — D. T. nel piccione cg. 20 per kg. s. c.
β-Atractylato di Bario	— Letale. — Gli animali muoiono coi muscoli in contrazione tonica e senza dispnea. — D. T. nel piccione cg. 20 per kg. s. c.

Atractylina (Zucchero + { atractyligenina o atractyliretina })

— Letale se è preparata di recente.
— Solubile in H^2O.
— Le soluzioni si alterano dopo 24 ore, e sono inattive.
— Gli animali muoiono senza convulsioni e senza dispnea.

Prodotti di scissione in ambiente.

acido	alcalino
Atractyliretina (simile al prodotto di scisssione acida)	**Atractyligenina** — Non letale. — Non irritante locale. — Insolubile in acqua.

Considerazioni e conclusioni.

In generale il quadro di intossicazione dei sali e dei derivati dell'ac. atractylico è, salvo poche differenze, quello dell'atractylato di potassio.

Le relazioni, tra azione biologica, tossicità e costituzione chimica di queste sostanze risultano evidenti dalle mie ricerche sui prodotti di scissione dell'atractylato, e mi permettono di seguire le modificazioni che si osservano nell'azione farmacologica mano mano che si asportano i diversi radicali che costituiscono la molecola. Quale è l'importanza del potassio?

Le esperienze cogli atractylati di K, Na, Ba, Mg, come quelle con i β-atractylati di K, Na, Ba, Mg stanno a dimostrare che l'azione convulsivante dell'atractylato di K sul bulbo e sul cervello è dovuta al radicale K: gli animali infatti intossicati cogli atractylati e coi β-atractylati di Mg, Ba, muoiono senza presentare convulsioni, mentre quelli trattati con atractylato e β-atractylato di Na, metallo molto vicino al K, presentano quasi la stessa sintomatologia degli animali avvelenati coll'atractylato di K, solo la dispnea e le convulsioni sono meno intense e durano meno a lungo.

L'acido valerianico ha nella molecola dell'atractylato di K un legame più debole che non l'abbia l'acido solforico ed è possibile quindi toglierlo sia arrestando la saponificazione dell'atractylato all'inizio, sia saponificando con mezzi adatti che limitano, a questa prima tappa della scissione, la loro azione.

La molecola dell'acido atractylico, o dell'atractylato di K, priva del gruppo valerianico forma l'acido β-atractylico e i β-atractylati che sono più solubili degli atractylati corrispondenti ed esplicano nell'organismo azione analoga a quelle degli atractylati, ma sono più tossici: gli animali muoiono in tempo minore di quelli trattati cogli atractylati.

Da ciò mi credo autorizzato a concludere che l'acido valerianico diminuisce la solubilità ed attenua la tossicità dell atractylato di K.

Se dalla molecola dell'atractylato si asporta, oltre il K ed il gruppo valerianico, anche l'acido solforico, il prodotto che resta — l'atractylina — è tossica negli animali solo se preparata di recente: essi si mostrano leggermente agitati, hanno disordini di moto e muoiono senza presentare dispnea e convulsioni.

L'atractylina, in soluzione, si scinde rapidamente e si mostra inattiva: gli animali, trattati con soluzione preparata da oltre 24 ore non presentano sintomi di avvelenamento.

L'acido solforico quindi salifica e rende stabile la molecola dell'atractylina.

Il fatto che, la soluzione di atractylina, preparata da qualche tempo, non è tossica, stava ad avvisarmi che i corpi nei quali si scinde

sono inattivi, infatti i prodotti di scissione alcalina — atractyligenina e glucosio — e quelli di scissione acida — atractyliretina e glucosio — si sono mostrati nelle mie ricerche privi di proprietà tossiche.

Il corpo più semplice dunque, al quale è possibile arrivare con la scissione alcalina dell'atractylato di K, è l'atractyligenina, sostanza inattiva, che, accoppiandosi al glucosio, acquista immediatamente azione tossica (atractylina). Questa unione, tra glucosio e atractyligenina, è verosimile avvenga a mezzo del gruppo aldeidico giacchè l'atractylina non riduce direttamente il liquido di Fehling.

L'atractylina, in soluzione acquosa, si scinde rapidamente in atractyligenina e zucchero ; colla introduzione del radicale solforico nella molecola, e conseguente salificazione, acquista maggiore stabilità.

È probabile che questa unione dell'atractylina coll'acido solforico avvenga per mezzo degli idrossili oppure per mezzo di un processo di eterificazione colla base fondamentale stessa (atractyligenina, glucosio).

Identiche supposizioni possiamo fare per l'acido valerianico che rende la molecola meno solubile, più stabile e leggermente meno tossica, ma dalle mie esperienze non risultano dati sufficienti per appoggiare le ipotesi sopra avanzate, ne i dati chimici che noi oggi possediamo, sulla costituzione della molecola dell'atractylato, ci possono venire in aiuto.

L'introduzione infine nella molecola del radicale potassio determina azione convulsivante a sede bulbo-cerebrale.

I resultati delle mie ricerche si possono cosi riassumere :

1) Il quadro di intossicazione, nelle linee generali per tutti i derivati, con poche differenze a seconda dei diversi corpi, è quello dell'atractylato di potassio.

2) Evidenti risultano le relazioni fra azione biologica, tossicità dell'atractylato di K e dei suoi derivati, e la loro costituzione chimica : l'azione biologica è dovuta all'accoppiamento della sostanza fondamentale — atractyligenina — coi diversi radicali.

3) L'atractyligenina è inattiva : accoppiandosi al glucosio — atractylina — diviene tossica.

L'introduzione dell' H^2SO^4 — ac. β-atractylico e β-atractylati — rende la molecola più stabile, più solubile, più tossica.

L'introduzione dell'acido valerianico — ac. atractylico, atractylati — diminuisce alquanto la solubilità ed attenua la tossicità.

La presenza del radicale K conferisce alla molecola azione convulsivante a sede bulbo-cerebrale.

—

BIBLIOGRAFIA.

LEFRANC. — Sur l'acide atractylique et les atractylates, produits immédiats de la racine de l'atractylis gummifera. — *Comptes rendus*. T. 67, pag. 954, anno 1868.

ID. — De l'acide atractylique et des atractylates. — *Journal de Pharmacie et de Chimie*, série IV, T. 9, pag. 81, anno 1869.

ID. — De l'acide atractylique. — *Comptes rendus*, T. 76, pag. 438, anno 1873.

ID. — De l'acide atractylique. — *Journal de Pharmacie et de Chimie*, série 4, T. 17, pag. 187, anno 1873.

ANGELICO. — Sui principi d'atractylis gummifera. — *Arch. Farm. Terap.*, vol. XIII, 1907—91. — *Gazzetta chimica Italiana*, XL, 1910 —. 403.

L. TOCCO. — Sull'avvelenamento per Carlina gummifera. — *Riforma medica*, anno 36, N° 33.

ID. — Sull'avvelenamento per Carlina g. — Nota II. Ricerche farmacologiche sul principio attivo della carlina gummifera (Atractylato di K). *Arch. Int. de Pharm. et de Therap.* vol XXVI, 1922.

RICCARDO LUZZATTO.

Il 27 Febbraio dell' anno corrente, vittima di acuta malattia, è morto a Modena RICCARDO LUZZATO, Prof. ordinario di Materia Medica e Farmacologia, nato a Venezia nel 1876.

Di Lui, che da giovane mi fu valoroso compagno di lavoro e più tardi amico caro e stimatissimo collega, io ho ampiamente scritto, illustrandone secondo il merito la figura di uomo e di scenziato, nel giornale *Biochimica e Terapia sperimentale*, di cui era attivissimo redattore e che alla sua memoria ha voluto dedicare un intero fascicolo, riportando anche l'indice bibliografico completo delle sue pubblicazioni e di quelle della sua scuola.

L'Università, nella quale con tanto onore insegnò, ha deliberato di porre, nell' Istituto da Lui diretto, una lapide a perpetuo ricordo dell' insigne Maestro.

Allievo dell' HOFMEISTER e dello SCHMIEDEBERG, appassionato e valente cultore degli studi chimici-biologici e farmacologici, lascia profonda traccia di sè con un opera scientifica assai pregevole e vasta, di gran lunga superiore alla brevità della vita, alimentata dal nobile ideale della scienza prediletta, a cui consacrò la sua feconda attività.

Con la scomparsa del LUZZATTO la Farmacologia Italiana perde uno tra i suoi migliori elementi, innanzi al quale aprivasi la via verso sempre più brillante avvenire ; e la sua perdita non può che destare vivo e sincero rimpianto, sopra tutti in chi ebbe la fortuna di conoscerlo da vicino e di apperzzarne, oltre le rare doti dell' intelletto elevato, quelle dell' animo squisitamente onesto e gentile.

Il suo esempio va additato alla nostra gioventù studiosa, specialmente nel tempo in cui meno si tendono a valutare il lavoro del pensiero e l'amore puro della ricerca scientifica.

R. ISTITUTO DI STUDI SUPERIORI.

FIRENZE. — Aprile 1922.

G. CORONEDI.

INSTITUT DE PHARMACODYNAMIE ET DE THÉRAPIE DE L'UNIVERSITÉ DE GAND.

Hyperthermie et augmentations du volume respiratoire et de l'élimination de l'anhydride carbonique par le bleu de méthylène

PAR

J. F. HEYMANS ET C. HEYMANS.

Pendant un séjour au laboratoire de Biologie du Collège de France (directeur Prof. E. GLEY), l'un de nous a démontré, en collaboration avec E. MAIGRE, que le bleu de méthylène peut supprimer l'action inhibitive du pneumogastrique sur le coeur de grenouille (1) et ensuite qu'il peut déterminer chez le chien une hyperthermie notable, atteignant 43° (2).

Les microbes pathogènes et leurs produits provoquent la fièvre ; la tétanisation électrique, ainsi que les convulsivants, tels la strychnine, la cocaïne, la β-tétrahydronaphthylamine(3), etc., élèvent la température par suite de la production calorique musculaire trop grande par rapport à la déperdition; d'autres composés enfin, tels l'adrénaline, les colloïdes, les solutions salées, etc., peuvent également déterminer des poussées de température par un mécanisme encore vague.

L'étude méthodique de l'action hyperthermisante du bleu de méthylène nous apprendra comment il agit et dès lors la place qu'il doit occuper parmi les hyperthermisants.

L'hyperthermie, quelque soit la cause qui la détermine, intéresse hautement la physiologie, à preuve les monographies importantes publiées sur cette question (4). L'hyperthermie doit encore intéresser

---

(1) C. HEYMANS et E. MAIGRE : *Action du bleu de méthylène sur l'appareil cardio-inhibiteur de la grenouille.* Comptes rendus de la Soc. de biologie, Paris. T. LXXXV. p. 45, 1921.

(2) C. HEYMANS et E. MAIGRE : *Le bleu de méthylène, corps hyperthermisant.* Comptes rendus de la Soc. de biologie, T. LXXXV, p. 141, 1921.

C. HEYMANS et E. MAIGRE : *Action hyperthermisante du bleu de méthylène.* Arch. Intern. de Pharm. et de Thérapie. Vol. 26, p. 129, 1921.

(3) LŒWIE : *Ergebnisse der Physiologie*, Bd. 1, S. 356, 1904.

(4) JULES LEFÈVRE : *Chaleur animale et bioénergétique.* Masson, Paris, 1911. AR. KANITZ : *Temperatur und Lebensvorgänge*, Berlin, 1915.

davantage le pathologiste et le clinicien qui la confondent souvent avec la fièvre, à preuve les termes de pyrétiques, pyrétogènes, antipyrétiques, antithermiques, etc., employés indifféremment pour désigner les agents qui provoquent la fièvre ou l'hyperthermie simple, soit les agents thérapeutiques tantôt spécifiques de la fièvre, telle la quinine dans le paludisme, tantôt symptomatiques, tels les dits antithermiques, à l'aide desquels on espérait guérir la fièvre, alors qu'ils ne font que supprimer passagèrement le symptome « hyperthermie ».

L'étude d'un hyperthermisant chimique nouveau, qui agit autrement que les thermogènes connus jusqu'ici, pourrait donc contribuer à faire progresser nos connaissances sur la bioénergétique, sur la fièvre et son traitement.

Aussi, l'action hyperthermisante du bleu étant établie, avons-nous immédiatement continué son étude et cela au triple point de vue de son pouvoir hyperthermisant et des modifications du volume respiratoire et de l'élimination carbonique qu'il produit.

Les résultats acquis jusqu'à présent sont consignés dans ce mémoire.

TECHNIQUE.

Bleu de méthylène. — Comme dans les huit expériences déjà publiées, nous nous sommes servis, dans les expériences rapportées plus loin, du bleu de méthylène pur des laboratoires BRUNEAU (Paris), en solution à 1 % dans la solution salée à 8.5 ‰. Les solutions de bleu étaient préparées le jour même ou tout au plus la veille de l'expérience, et conservées à l'abri de la lumière. Le bleu de méthylène pur de MERCK et celui de HOECHST sont également hyperthermisants. Nous croyons donc que c'est le bleu de méthylène, chimiquement pur et répondant à la formule (structure orthoquinoïdique)

$$(CH_3)_2{-}N{-}C_6H_3\begin{matrix} \diagup N \diagdown\!\!\diagdown \\ \\ \diagdown SCl \diagup\!\!\diagup \end{matrix}C_6H_3-N-(CH_3)_2$$

qui est la cause déterminante de l'hyperthermie. Nous conseillons de faire usage d'un bleu aussi peu altéré que possible et en solution fraîchement préparée, si on ne veut pas s'exposer à des variations considérables de la réaction hyperthermique.

Le bleu a été administré par voie endoveineuse, soit par doses fractionnées, soit par dose unique ; l'analyse de nos expériences indiquera la posologie et les précautions à prendre pour éviter le plus possible les réactions collatérales nuisibles que l'injection du bleu peut entraîner et qui viennent troubler l'action hyperthermique. Nous avons également pratiqué chez le chien l'injection hypodermique ou intrapéritonéale de doses appropriées de bleu; les résultats seront exposés dans une publication ultérieure.

Animaux. — Nos expériences ont porté sur le chien, cet animal s'est en effet montré le plus approprié; nous nous sommes servis d'animaux de races et d'âges différents, achetés depuis quelques jours. Nous croyons qu'il serait utile d'éviter toutes ces variations chez les animaux en expérience. Nous démontrerons plus loin par des exemples la variabilité de l'action du bleu de méthylène chez des animaux aussi différents sur lesquels nons avons expérimenté pour raison d'économie. Un autre facteur qui empêche ou favorise l'hyperthermie par le bleu, c'est la température de l'air ambiant.

Nous avons également examiné si l'hyperthermie se produit chez le lapin après injection intraveineuse, souscutanée ou intrapéritonéale de bleu; les résultats jusqu'ici ont été négatifs.

Par contre chez le chat, après injection intraveineuse, l'hyperthermie apparaît parfois, mais sans évoluer comme chez le chien.

Pour les besoins de nos expériences, portant sur la détermination de la température, du volume respiratoire et de l'élimination carbonique, le chien est fixé, en position ventrale ou dorsale, sur la table d'opération. On place un thermomètre rectal ordinaire ou un thermomètre maxima gradué en dixièmes et contrôlé ; on introduit une canule dans une des branches de la veine saphène externe ; on place une canule trachéale qui sera reliée ultérieurement à l'appareil de dosage.

Dispositif employé pour déterminer le volume respiratoire et l'anhydride carbonique éliminé. — Plusieurs méthodes ont été utilisées pour la détermination de CO^2 dans l'air expiré; les unes sont basées sur le dosage de CO^2 total éliminé pendant toute une expérience, tels les dispositifs de ATWATER, HALDANE, HANRIOT et RICHET, REGNAULT et REISET, etc.; les autres sont basées sur l'analyse d'une fraction de l'air expiré au moyen de l'appareil de ZUNTZ, de l'eudiomètre de LAULANIÉ, de HALDANE, etc.

Ces méthodes sont suffisantes pour certaines expériences, mais elles ne nous permettent point de suivre, pas à pas et dans ses détails, l'élimination carbonique d'un animal dont les conditions expérimentales varient continuellement.

C'est grâce à un dispositif déjà décrit par nous pour l'expérimentation sur le lapin (1), mais que nous avons adapté au chien, qu'il nous a été possible de déterminer la « courbe » de l'élimination carbonique durant les différentes phases de l'hyperthermie.

---

(1) *a)* J. F. HEYMANS : *Iso-hyper- et hypothermisation des mammifères par calorification et frigorification du sang de la circulation carotido-jugulaire anastomosée.* Arch. Intern. de Pharm. et de Thér. Vol. 25, p. 1, 1920.

b) C. HEYMANS : *Modifications du volume respiratoire et de l'élimination carbonique par les anesthésiques et par les hypnotiques.* Arch. Intern. de Pharm. et de Thér. Vol. 25, p. 493, 1921.

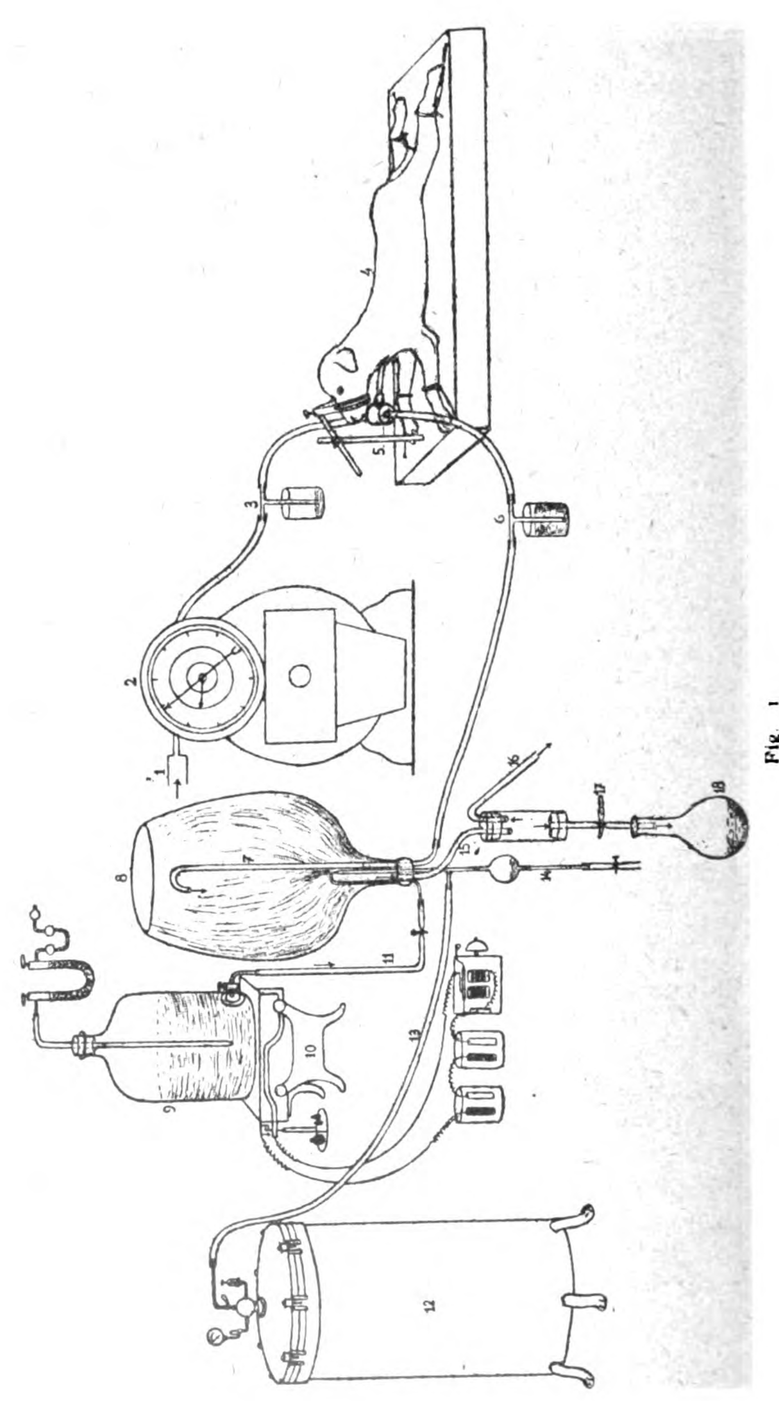


Fig. 1

Nous donnons ci-contre un schéma de l'appareil (fig. 1) et ci-dessous le texte explicatif de ce schéma. La canule trachéale du chien est reliée au système des valvules inspiratoire et expiratoire; nous notons synchroniquement la température rectale, le volume respiratoire donné par le grand compteur de 10 litres, le temps de la pulvérisation d'un poids déterminé de soude titrée (100 à 500 gr.) dans la grande tourie de 60 litres dans laquelle s'échappe l'air expiré. Le dosage ultérieur de la soude nous donne CO_2 éliminé pendant ce même temps.

FIG. 1.

1. Tube d'entrée de l'air inspiré pris à l'extérieur du laboratoire.
2. Compteur de 10 litres qui mesure le volume respiratoire.
3. Tube en T faisant fonction de manomètre à eau mesurant la pression inspiratoire négative.
4. Chien en expérience.
5. Valvules inspiratoire et expiratoire.
6. Tube en T faisant fonction de manomètre à eau mesurant la pression positive de l'expiration.
7. Extrémité du tube amenant l'air expiré en haut de la tourie.
8. Tourie de 60 litres.
9. Flacon de 10 litres avec soude à 20 ou 40 °/₀₀ (N/2 ou N).
10. Balance dont les fléaux, lorsqu'ils occupent la position horizontale, ferment le courant actionnant une sonnerie.
11. Tube avec vis de réglage amenant la soude au pulvérisateur.
12. Autoclave, générateur de vapeur d'eau sous pression.
13. Tube amenant la vapeur au pulvérisateur.
14. Tube collecteur de l'eau de condensation du tube 13.
15. Tube de sortie pour air et soude.
16. Tube de sortie de l'air expiré et dépouillé de CO^2.
17. Pince pour arrêter l'écoulement à chaque dosage ou sonnerie.
18. Ballon collecteur de la soude ; il renferme $BaCl^2$ qui transforme $Na^2 CO^3$ en $BaCO^3$ et NaCl et permet le dosage ultérieur de NaOH en excès, d'où par différence CO^2 fixé.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Nos expériences ont porté sur une soixantaine d'animaux. Par suite d'accidents, d'injections trop faibles ou trop fortes, d'hyperthermie nulle ou insuffisante, la moitié environ de ces expériences ont une signification trop incomplète pour être mentionnées. Il serait évidemment trop long de reproduire en détail les protocoles de toutes les expériences intéressantes ; nous nous contentons d'en résumer un certain nombre et seulement de reproduire in extenso les protocoles des expériences les plus typiques des trois séries; nous classons en effet nos expériences sur l'hyperthermie et les modifications de VR et CO^2 en trois grandes catégories :

A. Sous l'action de doses fractionnées de bleu de méthylène.

B. Sous l'action d'une dose massive unique de bleu de méthylène.

C. Sous l'action du bleu de méthylène chez le chien narcotisé ou curarisé.

Remarques préliminaires. — Pour faciliter la lecture et l'intelligence de nos protocoles d'expériences, ainsi que des tableaux et des courbes, rappelons quelques données classiques et indiquons le sens de nos abréviations :

1) *Protocoles*

N° D	= numéro du dosage.
T	= heure lue au chronomètre.
T'	= intervalle entre deux T.
VR	= volume respiratoire pendant le temps T'.
VCO^2	= volume de CO^2 éliminé pendant T'.
VR1'	= volume respiratoire par minute.
VCO^2 1'	= volume de CO^2 par minute.
VR1'K	= volume respiratoire par minute et par kilo d'animal; il est normalement de 0.3-0.4 l. pour un chien 4-8 k.
VCO^2 1'K	= volume de CO^2 éliminé par minute et par kilo d'animal; il est normalement de 10-11 cc. pour un chien de 4-8 k
P	= poids du chien.
R	= fréquence respiratoire par minute.
T°	= température rectale; elle est normalement de 38°5— 39°; elle s'abaisse chez le chien immobilisé.
C	= fréquence cardiaque.
RO	= réflexe oculaire.

2) *Tableaux.*

N°	= numéro du chien.
DT	= dose totale de bleu.
DK	= dose par kilo.
H^1	= heure au début de la partie de l'expérience considérée.
H^2	= heure à la fin de la partie de l'expérience considérée.
T° 1	= température à l'heure H^1.
T° 2	= température à l'heure H^2.
VRT	= volume respiratoire total pendant le temps H^2—H^1.
VRHM	= volume respiratoire moyen par heure.
VR1'M	= volume respiratoire moyen par minute.
VRHMK	= volume respiratoire moyen par heure et par kilo d'animal.
VR1'MK	= volume respiratoire moyen par minute et par kilo.
VCO^2T	= volume total de l'anhydride carbonique éliminé pendant le temps H^2—H^1.
VCO^2HM	= volume de CO^2 moyen par heure.
$VCO^2$1'M	= volume de CO^2 moyen par minute.
VCO^2HM	= volume de CO^2 moyen par heure et par kilo.
$VCO^2$1'MK	= volume de CO^2 moyen par minute et par kilo.

Chacune de nos expériences, à première vue complexes, demande évidemment de nombreux dosages et calculs, néanmoins toutes peuvent se réduire à un schéma qui est simple, à savoir :

1° Avant et après l'injection du bleu, on enregistre simultanément, à des intervalles de temps T'(2' à 5'), la température rectale T°, le volume respiratoire (VR) et le volume de CO^2 éliminé (VCO^2). En di-

visant le VR et le VCO^2 par le temps (T'), on obtient VR1' et $VCO^2$1'; divisant ces derniers résultats par le poids de l'animal, nous aurons le VR1'K et $VCO^2$1'K. Toutes ces données sont consignées dans les protocoles détaillés.

2° En additionnant tous les VR et VCO^2 d'un certain nombre de T', on obtient le VR et le VCO^2 total pendant un temps égal à la somme des T'. Divisant le total de VR et celui de VCO^2 par T'. exprimé d'abord en heures, ensuite en minutes, enfin divisant ces derniers résultats par le poids P de l'animal, nous obtiendrons le VRHM, VCO^2HM, ainsi que VR1'M et $VCO^2$1'M représentant la moyenne par heure ou par minute de VR et VCO^2; enfin les VRHMK, VCO^2HMK et les VR1'MK et $VCO^2$1'MK donnent les moyennes de VR et VCO^2 par minute et par kilo. Ces résultats sont également consignés dans les tableaux récapitulatifs.

3° En portant en ordonnée T°, VR1'K et $VCO^2$1'K, et en abcisse le temps, on construit trois courbes, celle de la température, celle du volume respiratoire, et celle du volume de CO^2 à la minute et au kilo. Ces courbes traduisent donc les modifications simultanées des T°, VR1'K et $VCO^2$1'K à chaque instant et pendant toute la durée d'une expérience.

A. — HYPERTHERMIE ET MODIFICATIONS DU VOLUME RESPIRATOIRE ET DE L'ÉLIMINATION CARBONIQUE SOUS L'ACTION D'INJECTIONS DE DOSES FRACTIONNÉES DE BLEU DE MÉTHYLÈNE.

Expérience I.

CHIEN 24 : 6100 gr., ♂, jeune, bâtard.

3 h. 30' : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

3 h. 52'	5 ctgr. bleu	38°	R 20
» 59'	» »	»	
4 h. 07'	» »	»	
» 15'	» »	38°1	R 36.
» 23'	» »	38°3	
» 35'	» »	38°7	Vomissement.
» 58'	» »	39°4	
5 h. 06'	» »	»	
» 32'	» »	39°5	
» 39'	» »	»	
» 50'	» »	39°6	
6 h. 02'	» »	»	R 70.
» 24'		—	Tué, congestion pulmonaire, un peu d'œdème.

Dose totale de 60 ctgr. de bleu en 2 h. 10' = 10 ctgr. au kilo.

T° : a passé de 38° à 39°6, soit + 1°6 en 1 h. 58'.

VR1'K : a atteint 1 l.

$VCO^2$1'K : 15.0 à 16.0 cc. à 39°5.

Expérience II.

CHIEN 25 : 8000 gr., ♀, adulte, à jeun depuis 5 jours.

3 h. 20' : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

3 h. 52'	5 ctgr. bleu	38°2	R 20.
4 h. 00'	» »		
» 08'	» »		
» 15'	» »		
» 23'	» »		
» 30'	» »		R 50-60.
» 34'	— —	38°3	
» 37'	— —	38°5	
» 56'	» »	39°	
5 h. 13'	— —	39°1	Début de polypnée.
» 33'	» »	39°6	Polypnée intense.
» 52'	— —	39°8	Mort.

Autopsie : fort œdème pulmonaire ; liquide spumeux s'écoule en grande quantité par canule trachéale.

Dose totale de 40 ctgr. de bleu en 1 h. 41' = 5 ctgr. au kilo.

T° : a passé de 38°2 à 39°8, soit + 1°6 en 2 h. ; le VR1' K a atteint 1.5 l.; $VCO^2$1'K. 14.0 à 15.0 cc (39°).

Ce chien est mort d'œdème pulmonaire, suite probable de l'action dépressive du bleu sur le cœur, et cela malgré la dose relativement petite.

Expérience III.

CHIEN 14 . 5300 gr., ♀, vieux, bâtard.

3 h. 00' : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

4 h. 14'	5 ctgr. bleu	39°1	
» 20'	» »		
» 27'	» »		
» 33'	» »		
» 42'	» »		Respiration s'accélère.
» 55'	» »	39°6	Vomissement.
5 h. 37'	» »	40°2	Polypnée.
» 47'	» »	»	
6 h. 12'	» »	»	Respiration faiblit.
» 20'	» »	40°4	
» 34'	— —	»	Convulsions, mort.

Dose totale de 50 ctgr. de bleu en 2 h. 06' = 9 ctgr. au kilo.

T° : a passé de 39°1 à 40°4, soit + 1°3 seulement en 2 h. 06'.

VR1'K : a atteint 2.1 l.

$VCO^2$1'K : de 10.2 cc. à 39°1, s'élève rapidement à 14.0—15.0—16.0 à 39°6-40°.

Cette expérience a été compliquée par le vomissement (animal non à jeun); pour cette raison, et plus encore par la dose de 9 ctgr. de bleu au kilo injectée trop rapidement, la respiration a faibli, l'hyperthermie a diminué au lieu d'augmenter, et la mort survint.

Expérience IV.

CHIEN 8 : 8200 gr., ♂, vieux bâtard.

3 h. 40 : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

4 h. 04'	5 ctgr. bleu	38°6	
» 09'	» »		
» 14'	» »		
» 20'	» »		
» 25'	— —		
» 36'	» »	38°9	
» 42'	» »	39°1	Polypnée.
» 56'	» »	39°5	
5 h. 16'	» »	39°6	
» 30'	» »	40°3	
6 h. 15'	— —	40°7	Mort après quelques convulsions.

Dose totale de 45 ctgr. de bleu en 1 h. 26' = 5,5 ctgr. au kilo.
T^{o} : de 4 h. 04' à 6 h. 15', a passé de 38°6 à 40°7, soit + 2°1 en 2 h. 11'.
VR1'K. : de 0.3—0,4 l. s'élève à 1.5 l.
VCO^{2}1'K : de 8.5 cc. atteint rapidement 14.0—15.0 cc. et s'y maintient.

Mort due probablement à une embolie par mobilisation d'un caillot, qui peut se ofrmer dans la veine saphène lorsqu'on n'a pas pris soin de pratiquer une injection d'eau physiologique après chaque injection de bleu.

Expérience V.

CHIEN 7 : 8900 gr., ♂, bâtard.

3 h. 30' : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

4 h. 15'	5 ctgr. bleu	39°6	
» 20'	» »	39°8	
» 26'	» »	»	R 18.
» 35'	» »	39°9	
» 41'	» »	40°	
» 48'	» »	40°2	R 28-30.
» 57'	— —	40°5	Polypnée débute et devient continue.
5 h. 07'	» »	40°9	
» 25'	» »	41°5	
» 40'	» »	42°	
» 47'	— —	42°5	
» 59'	— —	43°	
6 h. 10'	— —	43°5	
» 37'	— —	44°	Jusqu'ici pas de convulsion, pas d'agita-
» 41'	— —	44°1	tion ; RO = +.
» 45'	— —	44°2	RO = + ; C 240 ; petites secousses.
» 48'	— —	»	Arrêt respiratoire ; RO disparaît ; encore quelques contractions cardiaques.

Après la mort, le thermomètre ne monte plus ; à 7 h. 15' il est descendu à 44°.

Expérience typique ; seulement le dosage de CO^2 a été fautif, parce que ce chien de 9 kilos expira jusqu'à 15 litres d'air par 1' ; la quantité de soude diluée (1 cc. = 1 cc. CO^2) pulvérisée était trop faible, et la durée de contact de l'air expiré dans un ballon de 5 litres était de trop courte durée ; c'est cette expérience qui nous engagea à prendre de la soude à 20 °/₀₀ d'abord et ensuite à 40 °/₀₀, à remplacer le ballon de 5 litres par un de 10 litres, et ultérieurement par une tourie de 60 litres.

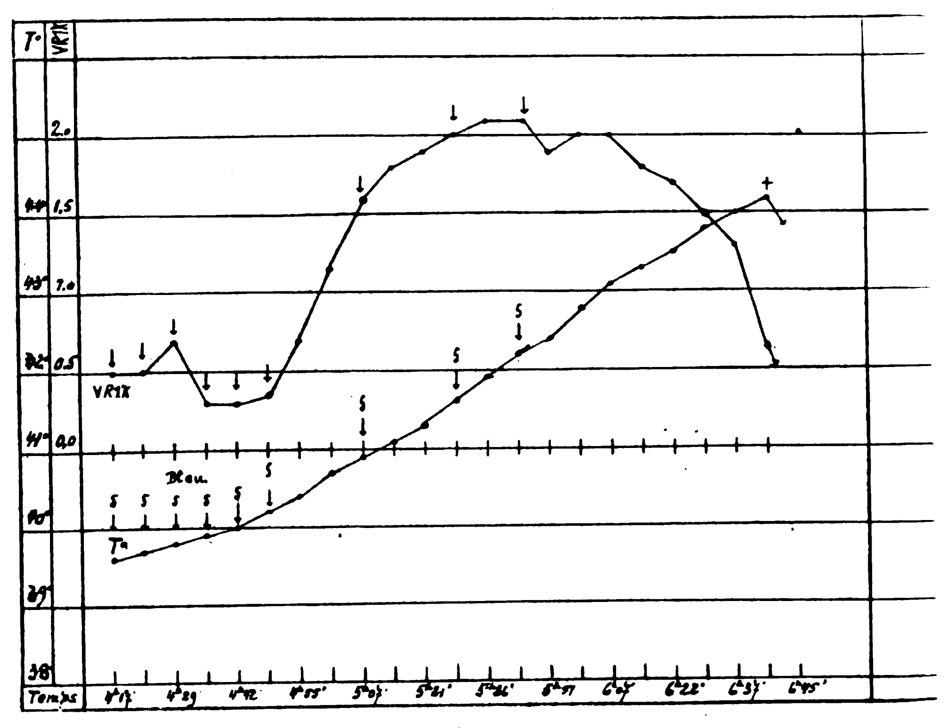


FIG. 2.

Dose totale de 45 ctgr. de bleu = 5 ctgr. au kilo.

T° : de 4 h. 15', début de la 1re injection, jusqu'à 6 h. 45', la température rectale de 39°6 monte progressivement jusqu'à 44°2, soit une hyperthermie, de + 4°6 en 2 h. 30'.

VR1'K : de 0.5 l. en moyenne, s'élève brusquement de 40°2 à 41°5', jusqu'à 2.0 litres ; de 41°5 à 43°2 se maintient à 2.0 l.; puis de 43°2 à 44°2, au lieu d'augmenter, il diminue progressivement et peu avant la mort il est tombé à 0.5 litre.

Expérience VI.

CHIEN 6 : 8800 gr., fox.

4 h. 40 : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

5 h. 15'	5 ctgr. bleu	38°6	R 16-20.
» 19'	» »	38°4	
» 24'	» »	38°6	
» 28'	» »	»	

5 h. 35'	5 ctgr. bleu	38°6	
» 37'	— —	38°7	R 35.
» 42'	» »	38°8	
» 50'	» »	39°	R 40.
» 53'	— —	»	Début de polypnée.
6 h. 05'	» »	39°3	Polypnée persistante.
» 10'	— —	39°5	
» 13'	— —	40°	
» 23'	» »	»	
» 28'	— —	40°4	
» 40'	» »	40°5	
» 57'	» »	40°9	
7 h. 05'	» »	41°	
» 14'	— —	41°3	

Expérience arrêtée ; animal tué.

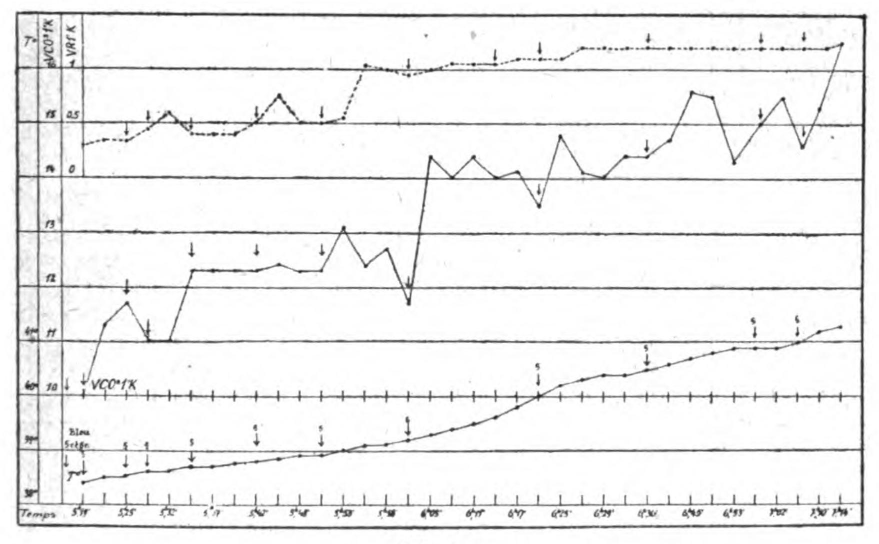


FIG. 3.

Dose totale de 60 ctgr. de bleu en 1 h. 50' = 7 ctgr. au kilo.

T° : 38°6 à 5 h. 15', s'élève progressivement jusqu'à 41°3 à 7 h. 14', soit + 2°7 en 1 h. 59'.

VR1'K : de 0.3-0.4 à 5 h. 15', augmente progressivement avec la température.

$VCO^2$1'K: de 10 cc. à la température 38°6, s'élève de même progressivement avec la température : de 39°5 à 40°5, il est de 14.0- 14.5 cc. ; de 40°5 à 41°, il est de 15.0-16.5 cc.

Pendant ce même temps de 1 h. 59', l'animal inspire 1171 l. d'air, soit 582 l. en une heure, ou 9.7 l. à la minute, soit 65 l. par heure et kilo ou 1.1 l. par minute et kilo.

Pendant ce même temps de 1 h. 59', l'animal élimine 13840 cc. de CO^2, soit 7200 cc. à l'heure ou 120 cc. à la minute, soit 798 cc. par heure et kilo ou 13.3 cc. par minute et kilo.

Expérience VII.

CHIEN 26 : 9800 gr., ♂, bâtard, à jeun depuis 5 jours.

4 h. : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

N° D	T	T'	VR	VCO^2	VRI'	VCO^2I'	VRI'K	$VCO^2I'K$	T°	Remarques
	4 h. 21'13"									
1	» 25'43"	4'30"	15	462	3.4	103	0.35	10.4		Calme.
2	» 28'07"	2'24"	13	373	5.4	150	0.55	15.0		Agitation relative
3	» 31'13"	3'06"	16	391	5.3	126	0.54	13.0		
4	» 35'03"	3'50"	18	548	4.8	148	0.50	15.1		Calme relatif.
5	» 39'01"	3'58"	12	620	3.0	136	0.30	13.8	38°	6ctgr. bleu; calme
6	» 43'05"	4'04"	18	428	4.8	105	0.50	10.7	»	Agitation.
	» 46'50"	3'45"	23	735	6.0	196	0.66	20.0	»	6 ctgr. bleu.
8	» 50'48"	3'58"	22	516	5.5	140	0.56	14.0	»	Agitation.
9	» 54'47"	3'59"	24	608	5.6	152	0.56	15.6	»	6 ctgr. bleu.
10	» 58'45"	3'58"	25	595	6.2	150	0.61	15.3	»	Agitation.
11	5 h. 02'43"	3'58"	15	544	3.7	137	0.40	13.7	»	6ctgr. bleu; calme
12	» 06'40"	3'57"	29	700	7.2	180	0.73	18.3	38°1	Agitation.
13	» 10'37"	3'57"	22	860	5.5	216	0.56	22.0	38°3	6 ctgr. bleu ; agi-
14	» 14'35"	3'58"	34	932	8.5	240	0.88	24.4	38°4	tation. R 60.
15	» 18'33"	3'58"	46	668	11.5	144	1.1	19.6	38°7	Polypnée inter-
16	» 22'33"	4'00"	46	715	11.5	179	1.1	18.3	39°	mittente. Calme
17	» 26'31"	3'58"	45	710	11.5	180	1.1	18.3	39°1	
18	» 30'29"	3'58"	47	676	11.8	145	1.2	14.7	39°2	
19	» 34'29"	4'00"	64	785	16.0	196	1.6	20.0	39°4	Polypnée conti-
20	» 38'27"	3'58"	61	780	15.9	192	1.6	19.8	39°5	nue.
21	» 42'24"	3'57"	62	620	16.0	156	1.6	15.8	39°5	
22	» 46'24"	4'00"	67	708	17.0	177	1.7	18.0	39°7	
23	» 50'22"	3'58"	73	998	18.0	252	1.9	25.7	40°	
24	» 54'22"	4'00"	72	940	18.0	235	1.9	24.0	40°2	
25	» 58'19"	3'57"	73	780	18.0	192	1.9	19.8	40°5	
26	6 h. 02'17"	3'58"	73	702	18.0	180	1.9	18.3	40°6	Toujours calme.
27	» 06'20"	4'03"	65	756	16.0	188	1.6	19.3	40°8	
28	» 10'13"	3'53"	61	820	15.0	211	1.5	21.5	40°9	
29	» 14'08"	3'55"	63	710	16.0	180	1.6	18.3	41°	
30	» 18'08"	4'00"	64	710	16.0	179	1.6	18.2	41°1	
			1067 l.	14571cc.						
	6 h. 22'53"	—	—	—	—	—	—	—	41°2	
31	» 26'50"	3'57"	66	720	17.0	180	1.7	18.3	41°3	Toujours calme.
32	» 30'48"	3'58"	66	831	17.0	210	1.7	21.5	41°4	
33	» 34'45"	3'57"	65	740	16.0	190	1.6	19.7	41°4	
34	» 38'43"	3'58"	65	664	16.0	168	1.6	17.1	41°5	
35	» 42'43"	4'00"	65	653	16.0	151	1.6	15.4	41°5	6 ctgr. bleu.

T	T'	VR	VCO^2	VR1'	VCO^21'	VR1'K	$VCO^21'K$	T°	Remarques
6 h. 46'43"	4'00"	62	663	15.0	165	1.5	16.7	41°5	
» 50'43"	4'00',	61	830	15.0	207	1.5	21.1	41°7	
» 54'43"	4'00"	63	720	16.0	180	1.6	18.3	41°7	Toujours calme.
» 58'44"	4'01"	60	653	15.0	163	1.5	16.2	41°8	
7 h. 02'44"	4'00"	60	720	15.0	180	1.5	18.3	41°9	
» 06'44"	4'00"	60	830	15.0	207	1.5	21.1	42°	6 ctgr. bleu.
» 10'44"	4'00"	55	703	14.0	191	1.4	19.4	42°	
» 14'44"	4'00"	55	700	14.0	175	1.4	17.8	42°2	
» 18'47"	4'05"	53	624	13.0	168	1.3	17.1	42°3	
» 22'47"	4'00"	52	664	13.0	166	1.3	16.8	42°4	Toujours calme.
» 26'49"	4'02"	54	720	13.0	179	1.3	18.3	42°6	
» 30'49"	4'00"	52	912	83.0	245	1.3	25.0	42°6	6 ctgr. bleu.
» 34'52"	4'03"	50	650	12.5	163	1.2	16.2	42°6	
» 38'52"	4'00"	44	675	11.0	169	1.1	17.2	42°8	R se ralentit.
» 42'52"	4'00"	37	659	9.2	156	0.9	15.9	42°8	Quelques secous-
» 46'52"	4'00"	28	592	9.2	148	0.9	15.1	43°	ses.
» 50'52"	4'00"	35	760	8.7	190	0.89	19.3	43°2	R très lente.
									Cœur très rapide.
		1198 l.	15752cc.						
» 54'50"	3'50"	11	557	30	139	0.3	14.2	43°2	

A 7 h. 53'30" arrêt d'abord respiratoire et ensuite cardiaque ; aucune convulsion.

Autopsie : poumons normaux.

Dose totale de 48 ctgr. de bleu = 5 ctgr. au kilo.

De 5 h. 02'43", 38°, à 6 h. 18'08", 41°1, soit en 1 h. 15'25", le chien n° 26 élimine un total. 14571 cc. de CO^2, soit 11548 cc. CO^2 par heure, ou 1178.4 cc. CO^2 par heure et par kilo, ou 64 cc. CO^2 par 1' et par kilo.

Pendant ce même temps de 1 h. 15'25", ce chien inspire 1067 litres d'air, soit 849 litres par re, ou 86.7 litres par heure et par kilo, ou 1.4 litre par 1' et par kilo.

De 6 h. 22'53", 41°2, à 7 h. 50'52", 43°2, soit en 1 h. 27'59", ce chien élimine un total de 52 cc. CO^2, soit 10742 cc. CO^2 par heure, ou 1096 cc. CO^2 par heure et par kilo, ou 18.27 cc. CO^2 1' et par kilo.

Pendant ce même temps de 1h. 27'59", ce chien inspire 1198 litres d'air, soit 817 litres par heure, 83.4 litres par heure et par kilo, ou 1.4 litre par 1' et par kilo.

Expérience VIII.

CHIEN 19 : 6700 gr., ♂, jeune, bâtard.

4 h. 30' : fixé, canule dans veine saphène.

4 h. 40'	5 ctgr.	bleu	38°9.
» 45'	»	»	39°.
» 50'	»	»	39°.
5 h. 05'	»	»	39°3.
» 15'	»	»	39°5.
» 40'	—	—	40°5.

Trachéotomie et canule reliée à l'appareil de dosage.

N° D	T	T'	VR	VCO^2	VR1'	VCO^21'	VR1'K	$VCO^21'K$	T°	Remarques
	5 h. 54'30"								41°2	
1	» 58'20"	3'50"	65	586	16.8	154	2.5	23.0	41°3	Polypnée; calme.
2	6 h. 01'30"	3'10"	56	515	18.0	162	2.7	24.0	41°4	
3	» 04'55"	3'25"	58	518	17.0	150	2.6	22.4		5 ctgr. bleu.
4	» 08'33"	3'38"	57	530	15.6	149	2.3	21.8	41°5	
5	» 12'05"	3'32"	63	555	18.0	156	2.7	23.4	41°6	Pas de convul-
6	» 15'38"	3'33"	68	563	19.2	163	2.9	24.3	41°8	sions, pas d'agi-
7	» 19'15"	3'37"	72	584	19.8	162	3.0	24	42°	tation.
8	» 22'53"	3'38"	72	570	19.8	162	3.0	24	42°2	
9	» 26'32"	3'39"	76	565	21.0	157	3.2	23.5	42°3	
10	» 30'08"	3'36"	72	531	19.8	146	3.0	21.9	42°5	
11	» 33'45"	3'37"	74	555	19.9	155	3.0	23.4	42°6	
12	» 37'24"	3'39"	73	555	19.8	154	3.0	23.2	42°7	
13	» 41'03"	3'39"	71	540	12.1	150	2.9	22.4	42°7	2 ctgr. bleu.
14	» 44'43"	3'40"	68	540	18.5	149	2.8	22.3	42°8	Paraît déprimé.
15	» 48'20"	3'37"	67	555	18.5	155	2.8	23.4	42°9	
16	» 51'59"	3'39"	67	535	18.5	147	2.8	22.0	43°	
17	» 55'43"	3'44"	77	524	20.6	141	3.1	21.0	43°2	
			1156	9324						

Détaché : animal titube ; forte polypnée ; pas d'agitations ni convulsions ; tache de suivre quand on l'appelle, œil vif. Le lendemain, est couché dans sa cage, ne mange pas. Mort le surlendemain.

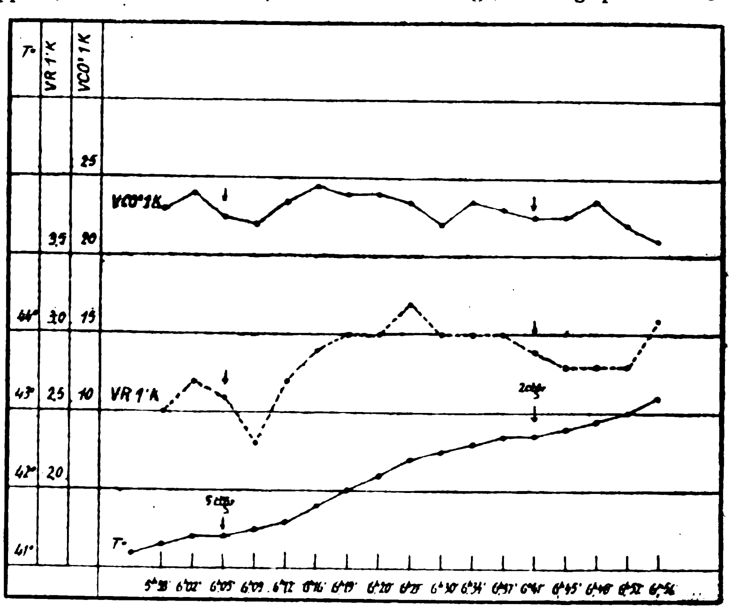


Fig. 4.

Dose totale de 32 ctgr. de bleu = 4,8 ctgr. au kilo.

T° : de 5 h. 54'30", 41°2, à 6 h. 55'43", 43°2, soit en 1 h. 01'13", le chien n° 19 élimine un total de 9324 cc. CO^2, soit 9111 cc. CO^2 par heure, ou 1360 cc. CO^2 par heure et par kilo, ou 7 cc. CO^2 par 1' et par kilo.

Pendant ce même temps de 1 h. 01′13″ ce chien inspire 1156 litres d'air, soit 1133 litres par heure, ou 170 litres par heure et par kilo, ou 2.83 litres par 1′ et par kilo.

La température, de 38°9 à 4 h. 40′, atteint 43°2 à 6 h. 56′, soit, en 2 h. 16′, une hyperthermie de + 4°4.

Les huit expériences qui précèdent confirment entièrement l'action hyperthermisante du bleu de méthylène. Depuis plus de quarante ans, cette substance a été l'objet d'expériences nombreuses dans les laboratoires les plus divers ; en clinique, on a injecté le bleu de méthylène à un nombre considérable de malades. Néanmoins, à notre connaissance, l'action hyperthermisante du bleu de méthylène n'est signalée nulle part : comment a-t-elle pu passer inaperçue ? Au début de nos recherches, nous nous étions figurés que l'hyperthermie chez le chien exigeait l'injection répétée de petites doses de bleu et défendait l'injection d'une dose massive. Pressés par le besoin de nos expériences présentes, qui tendaient à obtenir une hyperthermisation rapide et conséquemment des modifications prononcées de VR et VCO^2, nous nous sommes décidés à essayer la dose massive unique. A notre étonnement, après quelques échecs dus à ce que la dose unique, voisine de la dose mortelle limite, était injectée trop rapidement (voyez expériences IX, X et XI), les hyperthermies les plus typiques et les plus rapides ont été obtenues à la suite de l'injection d'une dose massive unique (expériences XII, XIII, XIV, XV, XVI).

B. — HYPERTHERMIE ET MODIFICATIONS DE VR ET VCO^2 SOUS L'ACTION DE L'INJECTION D'UNE DOSE MASSIVE UNIQUE DE BLEU DE MÉTHYLÈNE.

Expérience IX.

CHIEN 38 : 5500 gr., ♂, adulte, bâtard.

3 h. 15′ : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

3 h. 44′		37°9	
3 h. 46′	30 ctg. de bleu en 4′ =	5.5 ctg. par kilo.	
4 h. 00′	—	38°3	
4 h. 04′	—	38°5	Arrêt respiratoire, mort sans convulsions, respiration artificielle inefficace.

Expérience X.

CHIEN 41 : 5900 gr., ♂, adulte, bâtard.

10 h. 10′ : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

10 h. 48′	—	38°9	
10 h. 50′	30 ctg. bleu en 7′ = 5	ctg. par kilo.	
11 h. 10′	—	39°1	cœur lent.
11 h. 18′	—	39°5	Arrêt respiratoire, mort sans convulsions.

Autopsie : fort œdème pulmonaire. Prise de sang : hémolyse.

Expérience XI.

CHIEN 29 : 4400 gr., ♂, long poil, vieux.

3 h. 30" : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

3 h. 50'	25 ctgr. bleu en 5'	38°3	= 5.7 ctgr. par kilo.
4 h. 05'	—	38°4	
4 h. 10'	—	38°7	Polypnée.
4 h. 25'	—	39°7	Polypnée, calme.
4 h. 40'	—	40°4	Relié à l'appareil dosage CO^2.
4 h. 52'	—	40°6	VR = 44.6 l. en 3'40".
5 h. 03'	—	40°9	VR = 42.0 l. en 3'50".
5 h. 17'	—	41°4	VR = 30 l. en 3'34", resp. ralentie.
5 h. 28'	—	41°5	VR = 16 l. en 3'30".
5 h. 38'			Arrêt respiratoire. Mort.

Autopsie : œdème et stase pulmonaires considérables. Prise de sang : hémolyse.

Expérience XII.

CHIEN 22 : 5800 gr., ♂, vieux griffon.

3 h. 15' : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

N° D	T	T'	VR	VCO^2	VR1'	VCO^21'	VR1'K	$VCO^21'K$	T°	Remarques
	3 h. 43'10"									
1	» 47'10"	4'00"	29	—	7.1	—	1.2	—	38°7	Agitation.
2	» 51'05"	3'55"	14	305	3.5	78	0.6	13.4		»
3	» 54'58"	3'53"	10	330	2.0	84	0.4	14.4		»
4	» 59'50"	4'52"	14	427	3.0	87	0.5	15.0		»
5	4 h. 02'38"	2'48"	21	—	7.8	—	1.4	—		»
6	» 06'33"	3'55"	23	—	5.1	—	1.0	—		»
7	» 10'30"	3'47"	19	315	5.1	83	1.0	14.3		Ca[illegible]lme.
8	» 14'23"	3'53"	16	320	6.6	84	1.1	14.4	38°7	20 [illegible] ctgr. ble[illegible]
9	» 18'20"	3'57"	34	450	9.0	119	1.5	20.0		[illegible] 20'.
10	» 22'17"	3'57"	39	470	10.2	120	2.0	20.7	38°7	[illegible]o.
11	» 26'13"	3'56"	33	500	8.6	127	1.5	22.0	38°7	R 8[illegible]
12	» 30'08"	3'55"	41	530	9.6	136	1.7	23.5	38°9	Polyp[illegible]née, calme
13	» 34'02"	3'54"	51	496	13.2	123	2.3	21.2	39°2	
14	» 37'58"	3'56"	52	471	13.2	120	2.3	20.7	39°4	
15	» 41'54"	3'56"	49	486	12.0	124	2.1	21.3	39°7	
16	» 45'51"	3'57"	52	516	13.2	131	2.3	22.7	39°9	
17	» 49'51"	4'00"	53	490	13.2	122	2.3	21.0	40°3	
18	» 53'49"	3'58"	52	475	13.2	120	2.3	20.7	40°5	
19	» 57'48"	3'59"	51	450	13.2	114	2.3	20.0	40°7	
20	5 h. 01'45"	3'57"	50	450	13.1	114	2.3	20.0	40°9	
21	» 05'42"	3'57"	48	440	12.0	114	2.1	20.0	41°1	Toujours calme
22	» 09'40"	3'58"	46	428	12.0	108	2.1	18.6	41°2	

N° D	T	T'	VR	VCO^2	VR1'	VCO^21'	VR1'K	$VCO^21'K$	T°	Remarques
23	5 h. 13'36''	3'56''	44	417	11.4	106	2.0	18.2	41°3	
24	» 17'31''	3'55''	47	430	12.0	108	2.1	18.6	41°4	
25	» 21'31''	4'00''	48	423	12.0	105	2.1	18.0	41°5	
			684	6505						
	» 27'05''								41°7	
26	» 30'48''	3'43''	39	378	10.2	97	2.0	17.0	41°8	
27	» 34'30''	3'42''	36	350	9.6	90	1.7	15.5	41°9	Nausées.
28	» 38'10''	3'40''	33	330	9.0	96	1.5	16.5	42°	
29	» 40'00''	2'50''	21	337	7.4	—	1.3	—	—	
30	» 43'42''	3'42''	37	403	9.8	108	1.8	18.6	42°	
31	» 47'25''	3'43''	40	357	10.8	96	1.9	16.5	42°	2 ctgr. bleu.
32	» 51'07''	3'42''	36	365	9.8	100	1.8	16.9	42°1	
33	» 54'47''	3'40''	30	300	8.4	84	1.4	14.4	42°1	Quelques secousses musculaires
34	» 58'27''	3'40''	35	320	9.8	87	1.8	15.0	42°2	
			307	3140						
35	6 h. 02'05''	3'38''	18.8	275	5.2	75	1.0	13.0	42°4	
36	» 05'47''	3'42''	11.8	235	3.0	63	0.5	10.9	42°4	
37	» 09'23''	3'36''	5.4	185	1.5	51	0.3	8.9	42°5	
38	» 13'00''	3'37''	0.2	70	—	18	—	3.1	42°5	Mort sans convulsions.

Autopsie : œdème et stase pulmonaires.

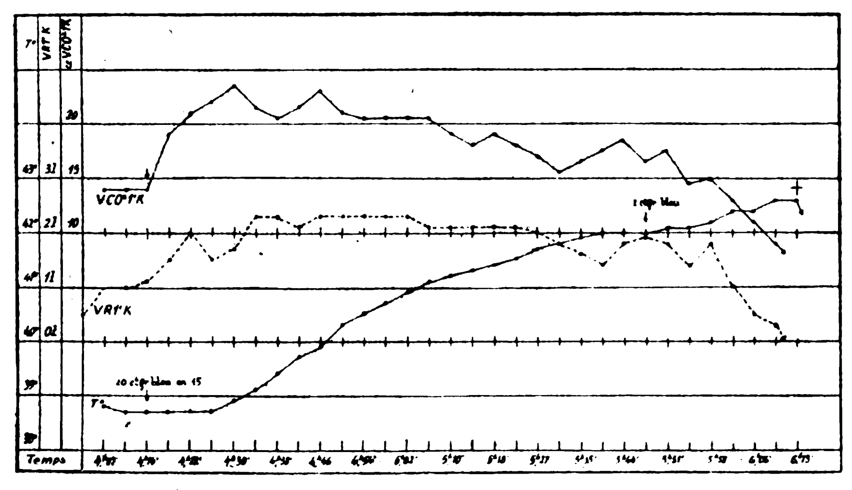


Fig. 5.

Dose unique de 20 ctgr. de bleu en 20' à 38°7, puis 2 ctgr. de bleu à 42°.

De 4 h. 26'13'', 38°7, à 5 h. 21'31'', 41°5, soit en 0 h. 55'18'' et pour une hyperthermie de + 2°8, le chien n° 22 inspire 684 litres d'air, soit 742 litres par heure ou 12.5 litres par 1', soit 2.89 litres par heure et par kilo ou 2.15 litres par 1' et par kilo.

Pendant ce même temps de o h. 55'18" et pour cette même hyperthermie de + 2°8, ce chien élimine 6505 cc. CO^2, soit 7058 cc. CO^2 par heure, ou 1217 cc. CO^2 par heure et par kilo, ou 2[illegible] cc. CO^2 par 1' et par kilo.

De 5 h. 27'05", 41°7, à 5 h. 58'27", 42°2, soit en o h. 31'22" et pour une hyperthermie de + 0°5, ce chien inspire 307 litres d'air, soit 587.2 litres par heure et par kilo, ou 1.7 litre par 1' et par kilo.

Pendant ce même temps de o h. 31'22" et même hyperthermie de + 0°5, ce chien élimine 314[illegible] cc. CO^2, soit 6006 cc. CO^2 par heure ou 100.1 cc. CO^2 par 1', soit 1034 cc. CO^2 par heure et par kilo, ou 17.23 cc. CO^2 par 1' et par kilo.

Expérience XIII.

CHIEN 42 : 5950 gr., ♂, jeune bâtard.

3 h. 10' : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

N° D	T	T'	VR	VCO^2	VR1'	VCO^21'	VR1'K	$VCO^21'K$	T°	Remarques
	3 h. 28'25"								38°9	
1	» 32'27"	4'02"	7	207	1.7	56	0.3	8.6	38°7	Calme.
2	» 36'30"	4'03"	9	247	2.1	60	0.35	10.0		»
3	» 40'23"	3'53"	11	233	2.5	60	0.4	10.0	38°6	»
4	» 44'13"	3'50"	44	457	11.4	120	2.0	20.0		Agitation répétée
5	» 48'05"	3'52"	11	289	2.6	744	0.4	12.5	38°5	25 ctg. de bleu en 5'
6	» 51'58"	3'53"	24	367	6.0	95	1.0	15.9	»	Calme.
7	» 55'45"	3'47"	35	770	9.0	204	1.5	34.3	38°7	Agitation.
8	4 h. 00'38"	3'53"	30	860	7.3	222	1.2	37.3	39°3	Calme complet
9	» 03'28"	3'50"	43	759	11.4	198	2.0	33.3	39°8	Polypnée inter-
10	» 07'20"	3'53"	51	647	12.8	168	2.2	28.2	40°2	mittente, puis
11	» 11'15"	3'55"	50	647	13.4	168	2.2	28.2	40°6	continue
12	» 15'05"	3'50"	32	703	13.8	183	2.3	30.9	40°9	Calme complet et
13	» 19'02"	3'57"	53	681	13.8	174	2.3	29.8	41°2	continu.
14	» 22'54"	3'52"	53	714	13.8	184	2.3	31.0	41°4	
15	» 26'43"	3'49"	53	647	13.8	169	2.3	28.3	41°7	
16	» 30'35"	3'52"	54	703	13.8	182	2.3	30.8	42°	
17	» 34'27"	3'52"	54	670	13.8	174	2.3	29.8	42°2	
18	» 38'20"	3'52"	56	714	14.4	184	2.4	31.0	42°4	
19	» 42'13"	3'53"	57	659	14.6	170	2.4	28.6	42°7	
20	» 46'08"	3'53"	58	659	14.6	169	2.4	28.3	42°9	
21	» 49'56"	3'48"	57	636	15.0	168	2.5	28.2	43°1	
22	» 53'45"	3'48"	55	569	14.4	150	2.4	25.2	43°2	
23	» 57'37"	3'52"	53	535	13.8	138	2.3	23.2	43°3	
24	5 h. 01'21"	3'51"	52	513	13.8	133	2.3	22.3	43°4	Quelques mouve-
25	» 05'21"	3'52"	53	524	13.8	135	2.3	22.8	43°5	ments convulsifs
26	» 09'12"	3'51"	52	467	13.4	120	2.2	20.0	43°6	répond à l'appel
27	» 13'02"	3'50"	50	491	13.4	127	2.2	21.3	43°7	Fibrillations mus- culaires.

N° D	T	T'	VR	VCO^2	VR1'	$VCO^2$1'	VR1'K	$VCO^2$1'K	T°	Remarques
28	5 h. 16'50"	3'48"	49	479	13.3	120	2.2	20.0	43°8	
			1123	14047						
29	» 20'44"	3'54"	47	479	12.0	122	2.0	20.6	43°8	Respiration se ralentit.
30	» 24'35"	3'49"	45	412	12.1	108	2.0	18.0	43°8	
31	» 28'25"	3'50"	43	412	12.0	108	2.0	18.0	43°6	
32	» 32'16"	—	—	—	—	—	—	—	43°4	
33	5 h. 36'08"	3'52"	40	435	10.0	113	1.7	19.0	43°2	
	6 h. 01'25"								42°7	
34	» 05'16"	3'51"	46	598	12.0	135	2.0	22.8	42°6	
35	» 09'06"	3'50"	30	390	7.8	102	1.3	17.0	42°5	R 72.
36	» 12'56"	3'50"	29	367	7.8	96	1.3	16.1	42°5	
37	» 16'53"	3'57"	28	445	7.0	113	1.2	19.0	42°5	
38	» 20'49"	3'56"	24	367	6.0	94	1.0	15.8	42°5	R 60.
39	» 24'45"	3'56"	24	347	6.0	91	1.0	15.2	42°5	Toujours aucun mouvement. Animal flasque.
40	» 28'42"	3'57"	22	347	5.1	91	0.85	15.2	42°5	
41	» 32'38"	3'56"	20	277	5.0	71	0.83	12.0	42°5	
42	» 36'38"	4'00"	19	347	4.9	87	0.8	14.8	42°5	

Animal détaché, reste couché, sans aucun mouvement.
A 5 h. 55' prélevé sang par ponction cardiaque : coagulation en 3'05".
A 6 h. 50', 42°5, ne réagit pas à la douleur.
A 7 h. R 30.
A 7 h 30', mort, 41°5.

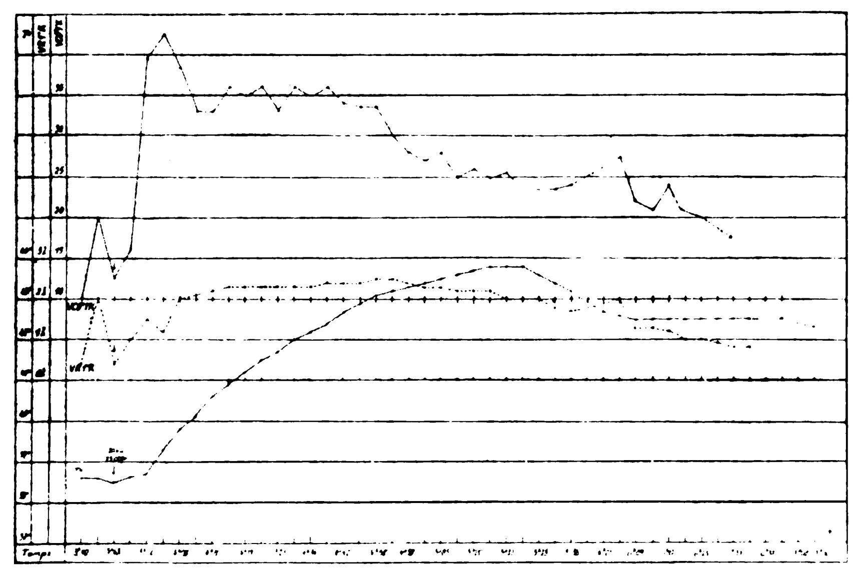


Fig. 9.

Dose unique 25 ctgr. de bleu = 4.1 ctgr. au kilo.

De 3 h. 51'58", 38°5, à 5 h. 16'50", 43°8, soit en 1 h. 24'52" et une hyperthermie de +5°3, le chien n° 42 inspire 1123 litres d'air, soit 798 litres par heure ou 13.3 litres par minute, soit 133 litres par heure et par kilo ou 2.2 litres par 1' et par kilo.

Durant ce même temps de 1 h. 24'52" et même hyperthermie de + 5°3, ce chien élimine 14047 cc. CO^2, soit 9936 cc. CO^2 par heure ou 165.6 cc. CO^2 par 1', soit 1656 cc. CO^2 par heure et par kilo, ou 27.6 cc. CO^2 par 1' et par kilo.

Expérience XIV.

CHIEN 32 : 6600 gr., ♂, adulte bâtard.

3 h. 15' : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

N° D	T	T'	VR	VCO^2	VRI'	VCO^2I'	VRI'K	$VCO^2I'K$	T°	Remarques
	4 h. 02'18"									
1	» 05'38"	3'20"	12	270	3.4	181	0.5	12.2	38°4	Agitation relative
2	» 10'12"	4'44"	24	335	4.8	71	0.7	10.7	38°2	»
3	» 14'07"	3'55"	22	340	6.0	86	0.9	13.0	38°1	»
4	» 17'55"	3'48"	19	328	4.8	86	0.7	13.0	38°0	30 ctg. de bleu en
5	» 21'40"	3'45"	30	418	7.8	112	1.2	17.0	38°3	3'.
6	» 25'25"	3'45"	29	600	7.6	160	1.1	24.2	38°6	Calme.
7	» 29'12"	3'45"	31	680	8.4	180	1.3	27.2	38°9	
8	» 32'58"	3'46"	46	870	12.0	231	2.0	35.0	39°3	Polypnée inter-
9	» 36'44"	3'46"	57	758	15.0	199	2.3	30.0	40°2	mittente, puis
10	» 40'30"	3'46"	63	795	16.8	210	2.5	31.8	40°7	continue. Tou-
11	» 44'13"	3'43"	69	926	18.6	250	3.0	38.2	41°4	jours calme.
12	» 48'00"	3'47"	78	860	20.4	228	3.1	34.5	41°7	
13	» 51'46"	3'46"	77	966	20.3	256	3.1	39.0	42°	
14	» 57'21"	5'35"	117	1657	21.0	240	3.2	36.4	42°6	
15	5 h. 02'37"	5'06"	103	1344	19.9	243	3.1	37.0	43°7	Respiration se ra-
16	» 07'46"	5'09"	85	1092	14.2	214	2.1	32.4	44°	lentit.
17	» 12'57"	5'11"	65	1160	12.5	224	2.0	34.0	44°2	Quelq. secousses.
18	» 18'08"	5'11"	26	1120	5.5	216	0.8	32.7	44°7	
			946	12828						
19	» 23'15"	5'07"	0.4	540	0.07	105.6	—	16.0	44°8	Accès épileptiforme et mort.

Autopsie : Fibrillation cardiaque, léger œdème et stase pulmonaire.

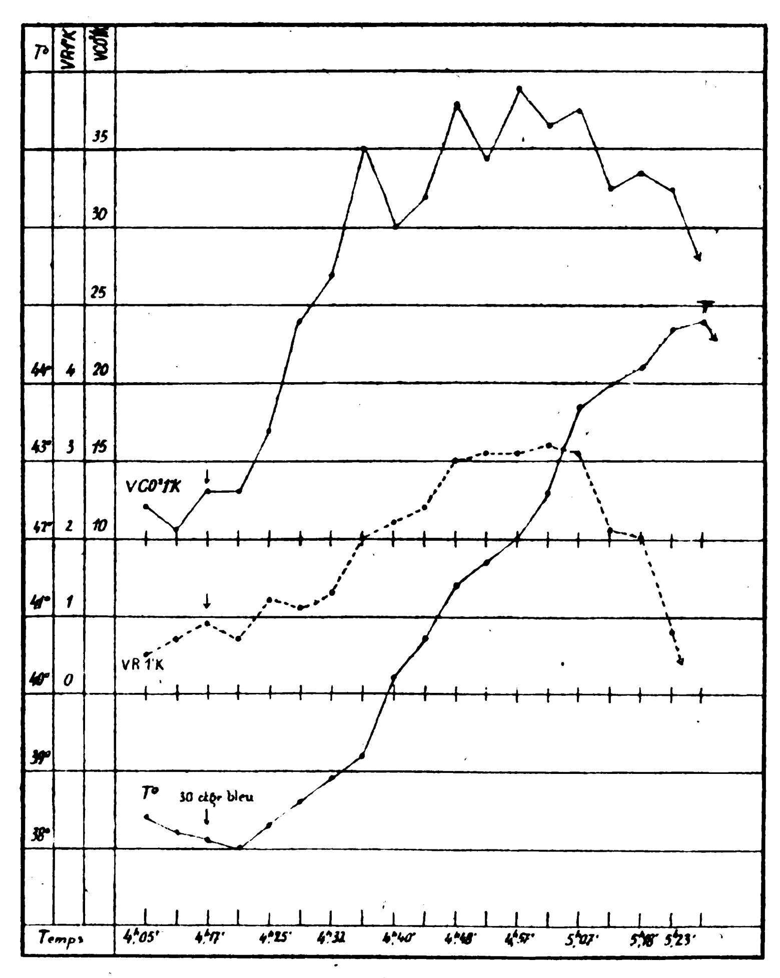


Fig. 7.

Dose unique de 30 ctgr. de bleu = 4.6 ctgr. au kilo.

De 4 h. 21'40", 38°3, à 5 h. 18'08", 44°7, soit en 0 h. 56'28" et une hyperthermie de + 6°4, le chien n° 32 inspire 946 litres d'air, soit 1005 litres par heure ou 16.75 litres par 1', soit 152.2 litres par heure et par kilo ou 2.54 litres par 1' et par kilo.

Pendant ce même temps de 0 h. 56'28" et même hyperthermie de + 6°4, ce chien élimine 12828 cc. CO^2, soit 13632 cc. CO^2 par heure ou 227.2 cc. par 1', soit 2066 cc. CO^2 par 1 h. et par kilo, ou 34.4 cc. CO^2 par 1' et par kilo.

Pourcentage de CO^2 dans l'air expiré pendant l'hyperthermie = 1.4 °/o.

Expérience XV.

CHIEN 43 : 5470 gr., ♂, adulte, bâtard, à très longs poils.

3 h. 20' : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

N° D	T	T'	VR	VCO^2	VRI'	VCO^2I'	VRI'K	$VCO^2I'K$	T°	Remarques
	3 h. 34'03"									
1	» 37'18"	3'15"	11	187	3.3	59	0.6	10.0	38°6	Calme.
2	» 40'35"	3'17"	24	345	7.4	102	1.3	18.7		Agitation.
3	» 45'45"	—	—	—	—	—	—	—		
4	» 49'50"	4'05"	26	537	6.5	131	1.2	24.0		Agitation répétée.
5	» 53'52"	4'02"	25	557	6.5	138	1.2	25.0	38°1	Agitation.
6	» 57'56"	4'04"	6	197	1.4	48	0.3	8.7		Calme.
7	4 h. 02'10"	4'14"	18	344	4.2	81	0.8	14.6	38°0	25 ctgr. en 5'.
8	» 06'32"	4'22"	34	479	7.2	114	1.3	21.0	38°4	Agitation.
9	» 10'53"	4'21"	44	927	10.2	212	2.0	38.7	39°1	Calme permanent.
10	» 15'15"	4'22"	36	857	8.4	197	1.5	36.3	39°8	Respir. s'accélère.
11	» 19'41"	4'26"	53	905	12.0	201	2.2	36.5	39°9	Polypnée inter-
12	» 24'07"	4'26"	63	940	14.2	212	2.6	38.7	40°7	mittente, puis
13	» 28'32"	4'25"	69	871	15.6	197	3.0	36.3	41°1	continue et forte.
14	» 32'45"	4'13"	70	882	17.0	211	3.1	38.6	41°4	Toujours calme.
15	» 37'08"	4'23"	73	860	16.7	196	3.1	36.1	41°7	
16	» 41'32"	4'24"	71	815	14.2	185	2.6	33.8	42°3	
17	» 43'43"	2'11"	35	430	16.6	197	3.1	36.3	42°6	
18	» 46'53"	2'10"	33	430	14.4	198	2.7	36.4	42°8	
19	» 48'06"	2'13"	33	419	14.4	189	2.7	34.5	43°1	
20	» 50'17"	2'11"	31	419	14.2	191	2.6	39.9	43°4	Réagit à l'appel.
21	» 52'28"	2'11"	29	511	14.1	239	2.5	43.6	43°5	Quelq. mouvem.
22	» 54'41"	2'13"	29	385	14.0	180	2.5	32.7	43°8	Calme.
23	» 56'50"	2'09"	25	407	12.5	194	2.3	36.4	43°8	
24	» 59'02"	2'12"	21	306	10.0	139	2.0	25.0	44°0	Quelq. mouvem.
25	5 h. 01'13"	2'11"	19	306	9.0	138	1.7	25.0	44°2	Calme.
26	» 03'25"	2'12"	16	430	7.5	197	1.4	36.3	44°4	Respir. ralentie.
27	05'37"	2'12"	13	508	6.0	234	1.1	42.7	44°8	Calme.
			773	11508						
28	» 07'48"	2'11"	8.4	231	4.0	106	0.7	19.3	44°8	
29	» 10'00"	2'12"	0.5	—	—	—	—	—	44°8	Mort.

Arrêt respiratoire à 5 h. 08' ; réflexe palpébral encore presque intact; mort sans aucun mouvement. Autopsie : pas d'œdème pulmonaire.

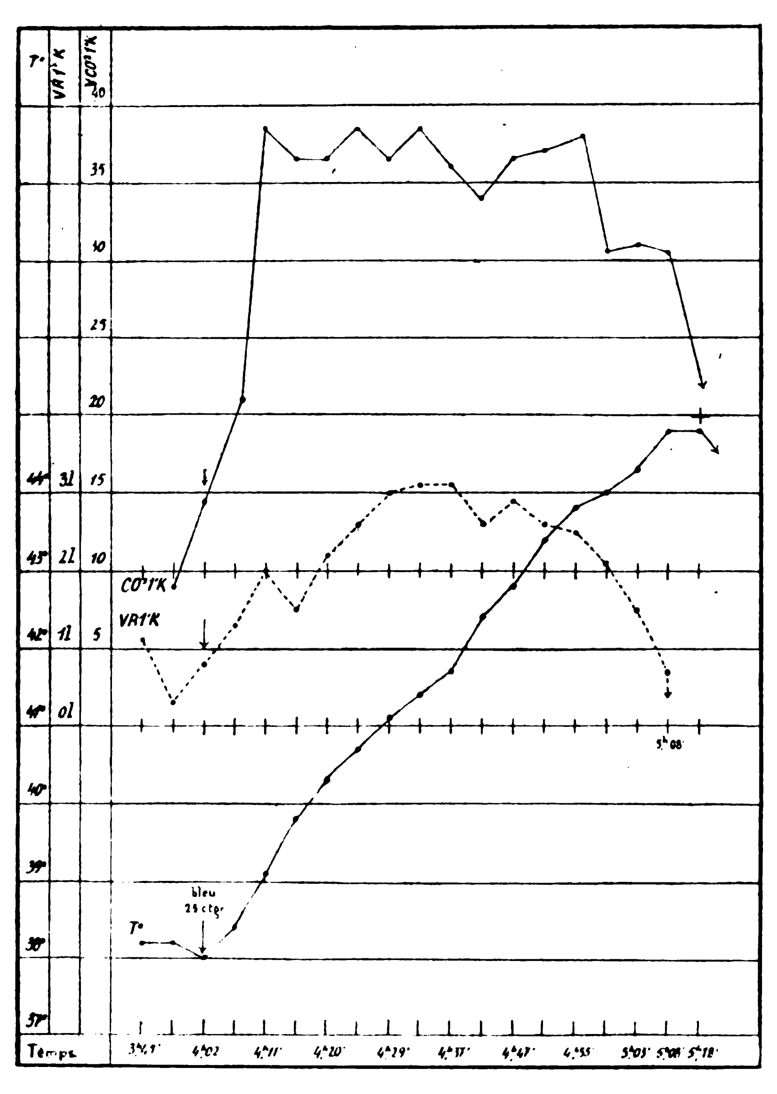


Fig. 8.

Dose unique de 25 ctgr. de bleu = 4.6 ctgr. au kilo.

De 4 h. 06'32", 38°4, à 5 h. 05'37", 44°8, soit en 9 h. 59'05" et une hyperthermie de + 6°4, chien n° 13 inspire 773 litres d'air, soit 785 litre par heure, ou 2.4 litres par 1' et par kilo.

Durant ce même laps de temps de 0 h. 59'05" et la même hyperthermie de + 6°4, ce chien mine 11508 cc. CO^2, soit 11688 cc. CO^2 par heure ou 194.8 cc. CO^2 par 1', soit 2136 cc. CO^2 par ure et par kilo, ou 35.6 cc. CO^2 par 1' et par kilo.

Expérience XVI.

CHIEN 34 : 4300 gr.

3 h. 30 : fixé, trachéotomie, canule dans artère fémorale et canule dans veine saphène.

N° D	T	T'	VR	VCO^2	VRI'	VCO^2I'	VRI'K	$VCO^2I'K$	T°	Remarques
	4 h. 34'30"									
1	» 36'00"	1'30"	2	92	1.3	61.2	0.3	14.0	37°6	Agitation.
2	» 37'30"	1'30"	2	49	1.3	32	0.3	7.3	»	Calme.
3	» 39'00"	1'30"	2	90	1.2	60	0.3	13.7	»	25 ctgr. de bl[illegible] en 3'.
4	» 40'32"	1'32"	15	212	9.6	138	2.2	32	»	
5	» 42'03"	1'31"	22	371	14.4	246	3.3	57	»	Agitation répété[illegible]
6	» 43'34"	1'31"	8	409	4.8	270	1.0	63	37°7	Se calme.
7	» 45'04"	1'30"	5	299	3.6	199	0.9	46.3	37°8	
8	» 46'34"	1'30"	6	326	3.7	217	0.9	50.0	38°	
9	» 49'41"	3'07"	11	598	3.5	192	0.9	44.6	38°5	
10	» 52'45"	3'04"	12	430	3.5	140	0.9	32.2	38°7	Salivation.
11	» 55'51"	3'06"	15	629	5.0	204	1.1	47.4	39°	Polypnée débute
12	» 58'58"	3'07"	22	567	7.0	180	1.6	41.8	39°3	
13	5 h. 02'05"	3'07"	27	464	9.0	144	2.0	33.5	39°5	Polypnée typique continue.
14	» 06'45"	4'40"	53	693	12.0	148	3.0	34.4	39°9	
15	» 11'28"	4'43"	58	879	12.1	186	3.0	43.3	40°3	
16	» 16'12"	4'44"	66	765	13.8	162	3.2	37.6	40°6	
17	» 20'56"	4'44"	72	813	15.0	168	3.5	39.0	41°	
18	» 25'42"	4'46"	78	669	16.2	135	4.0	31.4	41°4	
19	» 30'28"	4'16"	82	810	18.0	160	4.2	39.0	41°8	
20	» 35'13"	4'15"	85	683	18.0	144	4.2	33.5	42°1	
21	» 40'03"	4'50"	87	835	18.0	168	4.2	39.0	42°4	
22	» 44'55"	4'52"	86	813	18.0	162	4.2	37.6	42°6	Toujours calme
23	» 49'42"	4'47"	82	726	18.0	152	4.2	35.4	42°9	
24	» 54'30"	4'48"	80	669	16.8	135	3.9	31.4	43°	Saignée de 20 cc ; chute de pression notable et durable
25	» 59'17"	4'47"	70	746	14.4	156	3.3	36.3	43°1	
26	6 h. 05'00"	4'48"	62	683	12.9	142	3.0	33	43°1	
27	» 08'53"	4'48"	64	683	13.0	142	3.1	33	43°2	
28	» 13'40"	4'47"	58	708	12.0	147	3.0	34.1	43.3	
			1226	15580						
29	» 18'25"	4'45"	20.2	33.7	4.2	70.8	1.0	16.4	43°5	

Mort brusque à 6 h. 15'30". Chute brusque de la pression.
Autopsie : pas d'œdème pulmonaire ni stase.

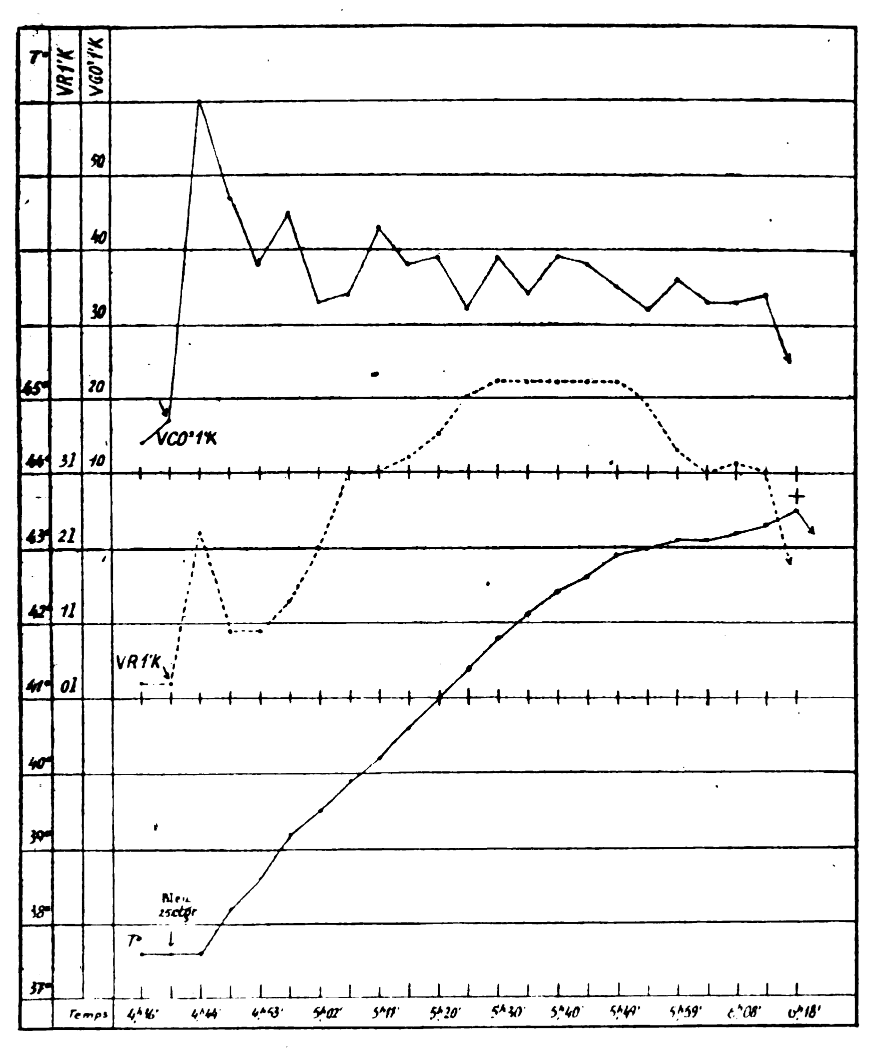


Fig 9.

Dose unique de 25 ctgr. de bleu = 6 ctgr. par kilo.

De 4 h. 39'00", 37°6, à 6 h. 13'40", 43°3, soit en 1 h. 34'40" et une hyperthermie de + 7, le chien n° 34 inspire 12216 litres d'air, soit 777 litres par heure, ou 181 litres par heure par kilo. ou 3.0 litres par 1' et par kilo.

Pendant ce même temps de 1 h 34'40" et pour la même hyperthermie de + 5°7 ce chien mine 15580 cc. CO^2, soit 9876 cc. CO^2 par heure ou 2297 cc CO^2 par heure et par kilo, ou 38.3 cc. $)^2$ par 1' et par kilo

A noter la chute notable et durable de la pression sanguine après une saignée de 20 cc. et la ›rt par arrêt du cœur. Une saignée de 20 cc. chez ce chien de 4.3 kilos, avec une hyperthermie 43°, correspondrait chez l'homme fébrile de 60-65 kilos à une saignée de 300 cc.

Nous récapitulons dans les tableaux I et II ci-contre (p. 469 et 470) les données fondamentales des seize expériences précédentes. Nous en tirons quelques conclusions qui servent d'introduction à la troisième partie de notre exposé expérimental.

Ces seize expériences démontrent à toute évidence que le bleu de méthylène en injection intraveineuse chez le chien peut l'hyperthermiser jusqu'à 44°8, et cela en moins d'une heure (exp. XIV et XV) (1). L'augmentation considérable de l'élimination de CO^2 prouve que la source de chaleur qui chauffe l'animal, malgré sa déperdition plus grande (2), se trouve dans une augmentation du métabolisme. La détermination du quotient respiratoire et le dosage simultané des divers produits cataboliques nous indiqueraient quelle part les hydrates de carbone, les graisses et les albumines prennent dans cette augmentation des combustions.

L'hypermétabolisme étant démontré, une question se pose naturellement au point de vue doctrinal : Quelle est l'augmentation fonctionnelle qui produit cette augmentation de CO^2 et quels sont l'organe ou les organes qui en sont le siège ?

Comme déjà dit au début de notre mémoire, la tétanisation électrique et les poisons convulsivants élèvent la température par l'hyperfonction musculaire.

Nos chiens injectés par le bleu ne présentent jamais d'état convulsif, clonique ou tonique, au cours de l'hyperthermisation autochtone ; les protocoles d'expériences le prouvent et nous indiquent que le bleu de méthylène n'est certes point un hyperthermique convulsivant. A ce point de vue, l'injection de bleu de méthylène à un chien en liberté est caractéristique : avant l'injection l'animal est souvent bruyant ; le bleu le calme, il se couche et bientôt le thermomètre rectal indique des températures de 40° et plus ; la polypnée s'installera et le contrôle du thermomètre note 41°-43° ; l'animal est toujours calme.

Donc point de convulsions chez l'animal hyperthermisé ; on pourrait faire l'hypothèse que le bleu surchauffe le chien en augmentant le tonus musculaire, éventuellement en produisant des frissons, tels que ceux de la lutte contre l'hypothermie. Mais ce tremblement musculaire ne s'observe point pendant l'hyperthermie progressive et le tonus physiologique, au lieu d'être augmenté, parait au contraire notablement diminué.

(1) Certains de nos animaux, pour des raisons non déterminées, ont réagi anormalement, en ce sens qu'après injection d'une dose massive appropriée, l'hyperthermie n'a apparu que très tardivement, après des heures, ou a même fait défaut.

(2) Cette question est traitée dans un mémoire qui paraîtra prochainement dans le livre jubilaire du professeur Zwaardemaker et dans ces Archives.

TABLEAU RÉCAPITULATIF I

Doses fractionnées

Exp.	N° du chien	Poids en kilo	Ctgr. de bleu		H^1	T°1	H^2	T°2	H^2—H^1	T°2—T°1	VRT en l.	VRHM en l.	VR1'M en l.	VRHMK en l.	VR1'MK en l.	VCO^2T en cc.	VCO^2HM en cc.	$VCO^21'M$ en cc.	VCO^2HMK en cc.	$VCO^21'MK$ en cc.
			DT	DK																
I	24	6.1	60	10	3h.58'	38°	6h.02'	39°6	2h.04'	+1°6	—	—	—	—	1.0	—	—	—	—	16.0
II	25	8.0	40	5	3h.52'	38°6	5h.52'	39°8	2h.00'	+1°6	—	—	—	—	1.5	—	—	—	—	14.5
III	14	5.3	50	9	4h.14'	39°1	5h.37'	40°4	1h.23'	+1°3	—	—	—	—	2.1	—	—	—	—	16.0
IV	8	8.2	45	5.5	4h.04'	38°6	6h.15'	40°7	2h.11'	+2°1	—	—	—	—	1.5	—	—	—	—	16.0
V	7	8.9	45	5	4h.15'	39°6	6h.45'	44°2	2h.30'	+4°8	1815	726	12.1	80.6	2.0	—	—	—	—	—
VI	6	8.8	60	7	5h.15'	38°6	7h.14'	41°3	1h.59'	+2°7	1117	582	9.7	65 0	1.1	13840	7210	120	798	13.3
VII	26	9.8	48	5	5h.03'	38°	6h.18'	41°1	1h.15'	+3°1	1067	849	14.6	86.7	1.4	14571	11548	196	1178	19.6
					6h.23'	41°2	7h.51'	43°2	1h.28'	+2°0	1198	817	13.6	83.4	1.4	15752	10742	179	1096	18.3
VIII	19	6.7	32	4.8	4h.40'	38°9	6h.56'	43°2	1h.16'	+4°3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
					5h.54'	41°2	6h.55'	43°2	1h.01'	+2°	1156	1133	18.9	170	2.8	9324	9111	280	1360	22.7

TABLEAU RÉCAPITULATIF II

Dose unique

Exp.	N° du chien	Poids en kilo	Ctgr. de bleu DT	Ctgr. de bleu DK	H^1	T^o1	H^2	T^o2	H^2—H^1	T^o2—T^o1	VRT en l.	VRHM en l.	VRl'M en l.	VRHMK en l.	VRl'MK en l.	VCO^2T en cc.	VCO^2HM en cc.	$VCO^2l'M$ en cc.	VCO^2HMK en cc.	$VCO^2l'MK$ en cc.
IX	28	5.1	30	5.5	3h.44'	37°9	4h.04'	38°5	0h.20'	+0°6	—	—	—	—	—	—	—	—	-	—
X	41	5.9	30	5.0	10h.48'	38°9	11h.18'	39°5	0h.30'	+0°6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
XI	29	4.4	25	5.7	3h.50'	38°3	5h.38'	41°4	1h.48'	+3°1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
XII	22	5.8	22	3.8	4h.26'13''	38°7	5h.21'31''	41°5	0h.55'18''	+2°7	684	742	12.4	128.9	2.2	6505	7058	117.6	1217	20.3
					5h.27'05''	41°7	5h.58'27''	42°2	0h.31'22''	+0°5	307	587	9.8	101.2	1.7	3140	6006	100.1	1034	17 2
XIII	42	6.0	25	4.1	3h.51'58''	38°5	5h.16'50'	43°8	1h.24'52''	+5°3	1123	798	13.3	133	2.2	14047	9936	165.6	1656	27.6
XIV	32	6.6	30	4.6	4h21'40''.	38°3	5h.18'08''	44°7	0h.56'28''	+6°3	946	1005	16.8	152	2.5	12828	13632	227.2	2066	34.4
XV	43	5.5	25	4.6	4h.06'32''	38°4	5h.05'37''	44°8	0h.59'05''	+6°4	773	786	13.1	144	2.4	11508	11688	194.8	2136	35.6
XVI	34	4.3	25	6.0	4h.39'00''	37°6	6h.13'40''	43°3	1h.34'40''	+5°7	1226	777	13.0	181	3.0	15580	9876	164.6	2297	38.3

C. — HYPERTHERMIE ET MODIFICATIONS DE VR ET VCO^2 SOUS L'ACTION DU BLEU DE MÉTHYLÈNE CHEZ LE CHIEN NARCOTISÉ OU CURARISÉ.

Comme l'ont déjà fait d'autres expérimentateurs dans des circonstances analogues, nous avons également retourné ce problème en nous demandant : est-il possible d'obtenir l'hyperthermie par le bleu chez un chien dont les muscles ne peuvent plus se contracter et, en outre, sont privés de leur tonus ?

Pour réaliser cet état chez le chien nous nous sommes adressés : 1°) au chloralose, paralysant cérébral ; 2°) au chloral, paralysant cérébral et médullaire ; 3°) enfin, au curare qui paralyse périphériquement le système nerveux moteur.

Le bleu augmente-t-il l'élimination carbonique et hyperthermise-t-il encore les chiens ainsi paralysés ?

Les expériences suivantes répondent à cette question, au moins en partie.

1° CHLORALOSE.

Expérience XVII.

CHIEN 46 : 6100 gr., ♂, adulte.

3 h. 20' : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

3 h. 30'	70 ctgr. chloralose	38°8	
» 40'		38°8	
» 54'	Narcose complète	38°2	
4 h. 04'	25 ctgr. bleu en 5'		
» 08'	—	38°1	
» 12'	—	38°	
» 17'			Mort ; par la canule trachéale s'écoule un liquide spumeux très abondant. Fort œdème et stase pulmonaire.

Remarques. — Si la dose unique de 4-6 ctgr. au kilo nous a donné les hyperthermies les plus rapides et les plus typiques chez le chien non chloralosé il n'en est pas de même chez l'animal chloralosé; l'action cardiaque dépressive du chloralose s'ajoute à celle du bleu et la mort survient rapidement. Par contre, comme le démontrent les expériences ci-dessous XVIII et XIX, les doses fractionnées et répétées de bleu nous ont donné chez les chiens chloralosés n° 48 et n° 50, les résultats intéressants consignés dans les protocoles détaillés.

Expérience XVIII.

CHIEN 48 : 7300 gr., jeune, bâtard.

10 h. : fixé, trachéotomie et canule dans veine saphène.

N° D	T	T'	VR	VCO^2	VRI'	VCO^2I'	VRIK	VCO^2IK	T°	Remarques
	10 h. 15'54"	—	—	—	—	—	—	—	38°2	
1	» 18'04"	2'10"	5.2	139	2.5	64	0.34	8.70		Calme.
2	» 20'18"	2'14"	5.4	150	2.5	67	0.34	9.10	38°	
3	» 22'26"	2'08"	7.2	240	3.5	112	0.49	15.30	38°1	80 ctgr. chloral…
4	» 24'36"	2'10"	6.6	150	3.2	69	0.44	9.45		en 7'. Modific…
5	» 26'47"	2'11"	3.4	183	1.6	84	0.22	11.50	37°8	tion respiratoir…
6	» 28'58"	2'11"	3.4	195	1.6	89	0.22	12.16	37°6	phase d'excita…
7	» 31'11"	2'13"	3.8	116	1.7	52	0.22	7.15	37°4	Narcose avec re…
8	» 33'22"	2'11"	3.2	116	1.5	53	0.21	7.23	37°4	lachement mus…
9	» 35'36"	2'14"	3.8	116	1.7	52	0.22	7.06	37°2	culaire.
10	» 37'48"	2'12"	3.6	105	1.6	47	0.22	6.49	36°9	
11	» 39'58"	2'10"	2.6	105	1.2	48	0.16	6.57	36°8	
12	» 42'17"	2'19"	3.0	105	1.2	45	0.16	6.16	36°7	R très lente.
13	» 44'33"	2'16"	3.0	105	1.2	46	0.16	6.32	36°6	
14	» 46'49"	2'16"	3.4	105	1.5	46	0.21	6.32	»	5 ctgr. bleu en 3'…
15	» 49'06"	2'17"	4.4	150	1.8	65	0.23	8.96	36°5	
16	» 51'21"	2'15"	5.2	161	2.3	71	0.32	9.78	36°6	5 ctgr. bleu en 3'…
17	» 53'35"	2'14"	5.2	183	2.3	82	0.32	11.18	36°7	
18	» 55'49"	2'14"	5.8	295	2.5	87	0.34	11.91	36°8	5 ctgr. bleu en 3'…
19	» 58'02"	2'13"	5.2	251	2.3	113	0.32	15.45	36°8	
20	11 h. 00'14"	2'12"	5.2	217	2.3	98	0.32	13.47	36°9	5 ctgr. bleu en 3…
21	» 02'28"	2'14"	5.2	240	2.3	107	0.32	14.63	36°9	
22	» 04'44"	2'16"	5.8	182	2.5	80	0.34	11.01	37°	5 ctgr. bleu en 3…
23	» 06'59"	2'15"	6.0	184	2.7	81	0.37	11.09	37°	
24	» 09'10"	2'11"	6.6	240	3.0	109	0.40	14.96	37°	5 ctgr. bleu en 3'
25	» 11'23"	2'13"	6.4	261	2.8	118	0.39	14.74	37°	Léger tremble-
26	» 13'33"	2'10"	6.4	228	2.8	105	0.39	14.38	37°	ment dans mus-
27	» 15'50"	2'17"	6.2	296	2.7	129	0.37	17.67	37°1	cles des épaules
28	» 18'05"	2'15"	6.2	228	2.7	101	0.37	13.89	37°2	
29	» 20'19"	2'14"	6.2	239	2.7	107	0.37	14.63	37°3	
30	» 22'33"	2'14"	6.2	228	2.7	102	0.37	13.97	37°4	Toujours léger
31	» 24'47"	2'14"	6.3	228	2.7	102	0.37	13.97	37°6	tremblement
32	» 27'03"	2'16"	6.3	251	2.7	110	0.37	15.12	37°7	
33	» 29'18"	2'15"	6.3	228	2.7	101	0.37	13.89	37°8	5 ctgr. bleu en 3…
34	» 31'34"	2'16"	6.4	228	2.8	96	0.38	13.15	37°8	Toujours trembl.
35	» 33'50"	2'16"	6.6	228	3.0	96	0.41	13.15	37°9	
36	» 36'05"	2'15"	6.9	273	3.1	121	0.42	16.60	38°	5 ctgr. bleu en 3'
37	» 38'22"	2'17"	7.5	240	3.3	104	0.45	14.16	38°	
38	» 40'39"	2'17"	7.6	251	3.4	110	0.46	15.06	38°1	
39	» 42'56"	2'17"	7.7	251	3.4	110	0.46	15.06	38°1	R 25.
40	» 45'16"	2'20"	8.0	251	3.4	107	0.46	14.71	38°2	
41	» 47'35"	2'19"	8.4	296	3.6	127	0.50	17.42	38°3	
42	» 49'59"	2'14"	9.0	308	4.0	137	0.55	17.39	38°3	Trembl. disparu.
43	» 52'26"	2'27"	9.4	285	4.0	120	0.55	16.4	38°4	

	T	T'	VR	VCO^2	VRI'	VCO^2I'	VRI'K	$VCO^2I'K$	T°	Remarques
4	11 h. 55'06"	2'36"	9.4	296	3.6	113	0.50	15.1	38°5	
5	» 58'20"	3'14"	12.8	351	4.2	108	0.57	14.8	38°6	
	12 h. 36'49"	—	—	—	—	—	—	—	38°7	
6	» 38'59"	2'10"	4.6	129	2.3	60	0.32	8.2	38°7	5 ctgr. bleu en 3'.
·	» 41'10"	2'11"	5.0	285	2.3	130	0.32	19.0		
3	» 43'20"	2'10"	4.8	273	2.4	126	0.33	18.0		5 ctgr. bleu en 3'.
9	» 45'32"	2'12"	5.4	217	2.4	98	0.33	13.5		
o	» 49'54"	4'22"	11.0	434	2.4	98	0.33	13.5	38°6	Toujours immo-
1	» 54'16"	4'22"	10.6	367	2.4	84	0.33	11.5	38°6	bilité complète
2	» 58'40"	4'24"	10.6	367	2.4	83	0.33	11.4	38°6	et paralysie mus-
3	1 h. 03'01"	4'21"	10.4	356	2.3	81	0.32	11.2	38°6	culaire.
4	» 07'21"	4'20"	10.0	334	2.3	78	0.32	10.7		
5	» 11'42"	4'21"	10.2	334	2.3	78	0.32	10.7	38°6	
6	» 16'02"	4'20"	10.0	345	2.3	80	0.32	11.3	38°6	
7	» 20'22"	4'20"	10.8	367	2.4	84	0.33	11.5	»	5 ctgr. bleu en 1'.
8	» 24'38"	4'16"	11.4	379	2.6	90	0.34	12.4	38°6	Pas de saliva
9	» 28'54"	4'16"	10.6	447	2.4	102	0.33	14.0	38°6	tion.
o	» 33'12"	4'18"	10.6	390	2.4	96	0.33	12.5	»	
1	» 37'30"	4'18"	10.8	367	2.4	84	0.33	11.5		
2	» 41'48"	4'18"	10.7	367	2.4	84	0.33	11.5	38°5	
3	» 46'03"	4'15"	10.0	356	2.3	84	0.32	11.5		
	2 h. 00'32"	—	—	—	—	—	—	—	38°5	5 ctgr. bleu en 1'.
4	» 04'35"	4'03"	11.0	—	—	—	0.32	—	38°5	Quelques mou-
5	» 08'43"	4'08"	14.8	412	3.7	96	0.50	13.2	38°5	vements. Se ré-
6	» 15'35"	6'52"	22.0	641	3.0	92	0.40	12.6		veille légèrem.
7	» 19'37"	4'02"	11.2	491	3.0	122	0.40	16.5	38.5	5 ctgr. bleu en 1'.
8	» 23'42"	4'05"	15.6	379	3.9	95	0.52	13.1	38°6	Quelques mouve-
9	» 27'49"	4'07"	17.4	479	4.2	120	0.58	16.4		ments.
o	» 31'57"	4'08"	14.0	479	3.4	120	0.46	16.4	38°7	20 ctgr. chloralose
1	» 36'03"	4'06"	14.8	436	3.7	108	0.50	14.8	38°8	Narcose complète
2	» 40'12"	4'09"	9.7	323	2.5	78	0.33	10.0	38°8	
3	» 44'16"	4'04"	9.7	390	2.5	97	0.33	13.4	38°8	
4	» 48'21"	4'05"	9.8	356	2.5	89	0.34	12.3	38°8	
5	» 52'21"	4'00"	9.6	356	2.7	89	0.35	12.3	38°8	
	3 h. 03'40"	—	—	—	—	—	—	—	38°8	
	» 57'21"	—	—	—	—	—	—	—	—	
6	4 h. 01'23"	4'01"	12.4	—	—	—	—	—	38°5	Narcose incom-
7	» 05'27"	4'04"	11.4	367	3.0	91	0.40	12.5	38°5	plète.
8	» 09'33"	4'06"	11.6	458	2.9	111	0.38	15.2	38°5	10 ctgr. bleu en 2':
9	» 13'42"	4'09"	19.0	390	5.0	94	0.69	13.2	38°6	secousses.
o	» 17'54"	4'12"	18.4	390	4.6	96	0.63	13.2	38°8	
1	» 22'06"	4'12"	15.6	412	3.6	95	0.50	13.1	38°9	
2	» 26'19"	4'13"	15.9	400	3.6	95	0.50	13.1	39°	
3	» 30'32"	4'13"	17.7	334	4.1	80	0.58	11.0	39°	
4	» 34'45"	4'13"	14.6	277	3.4	66	0.46	9.0	39°	10 ctgr. bleu 2'.
5	» 38'56"	4'11"	22.4	513	5.4	120	0.74	16.4	39°1	Touj. secousses.
6	» 43'08"	4'12"	19.5	547	4.6	130	0.63	18.0	39°2	
7	» 47'23"	4'15"	18.1	625	4.3	146	0.59	20.0	39°4	

Nº D	T	T'	VR	VCO^2	VR1'	VCO^21'	VR1'K	$VCO^21'K$	T°	Remarques
88	4 h. 51'38"	4'15"	27.4	547	6.4	130	0.87	18.0	39°6	10 ctgr. bleu en
89	» 55'53"	4'15"	22.4	647	5.2	150	0.72	20.1	39°9	
90	5 h. 00'05"	4'12"	23.2	412	5.4	98	0.74	13.5	40°1	
91	» 04'17"	4'12"	23.2	491	5.4	117	0.74	16.0	40°2	Touj. secousse
92	» 08'27"	4'10"	21.6	479	5.3	120	0.73	16.4	40°3	10 ctgr. bleu en
93	» 12'39"	4'12"	31.2	400	7.3	95	1.00	13.1	40°5	Salivation, agi-
94	» 16'49"	4'10"	40.4	423	9.6	102	1.30	14.0	40°8	tions.
95	» 20'59"	4'10"	42.0	625	10.2	105	1.40	20.1	41°	Début de polyp
96	» 25'07"	4'08"	46.0	614	11.1	148	1.52	20.1	41°2	
97	» 29'15"	4'08"	47.0	600	11.4	146	1.53	20.0	41°3	
98	» 33'25"	4'10"	50.5	589	12.0	140	1.64	19.9	41°5	Polypnée presque
99	» 37'33"	4'08"	51.5	596	12.6	150	1.70	20.1	41°6	continue.
100	» 41'42"	4'09"	51.5	600	12.6	146	1.70	20.0	41°8	20 ctg. chloralose
101	» 45'50"	4'08"	47.0	547	11.4	130	1.53	18.0	41°9	Polypnée inter-
102	» 50'00"	4'10"	31.5	556	7.3	132	1.00	18.1	41°9	mittente, réso-
103	» 54'11"	4'11"	22.8	491	5.2	117	0.72	16.0	41°9	lution muscul
104	» 58'22"	4'11"	18.2	423	4.3	102	0.59	14.0	41°9	Polypn. dispar
105	6 h. 02'32"	4'10"	15.6	412	3.6	95	0.50	13.1	416	
106	» 06'42"	4'10"	14.6	425	3.6	103	0.50	14.1	41°9	R 30 par 1'. mal-
107	» 10'50"	4'08"	14.2	412	3.6	102	0.50	14.0	41°9	gré tp. de 41°9.
	» 19'00"	—	—	—	—	—	—	—	42°	R 24; plus la
	» 24'27"	—	—	—	—	—	—	—	42°1	moindre secous
108	» 28'38"	4'11"	16.8	614	4.0	147	0.57	20.0	42°2	R 36; quelques
109	» 32'52"	4'13"	18.6	502	4.3	120	0.59	16.4	42°2	petis mouvem
110	» 37'08"	4'16"	21.4	491	4.9	114	0.68	15.8	42°2	R 43.
111	» 41'22"	4'14"	23	513	5.4	120	0.74	16.4	42°2	R 60; se reveille
112	» 45'39"	4'17"	26.4	513	6.0	118	0.8	16.3	42°3	légèrement
113	» 49'55"	4'16"	29.8	569	7.0	135	0.98	19.8	42°4	Quelques petits
114	» 54'11"	4'16"	30	600	7.0	140	0.98	19.9	42°5	mouvements;
115	» 58'28"	4'17"	32	524	7.1	120	0.99	16.4	42°7	membres flas-
116	7 h. 02'43"	4'15"	32.5	502	7.7	120	1.05	16.4	42°8	ques.
117	» 07'00"	4'17"	32.0	524	7.7	120	1.05	16.4	43°	
118	» 11'15"	4'15"	33.3	569	7.8	135	1.06	19.8	43°1	
119	» 15'31"	4'16"	32.2	547	7.7	130	1.05	18.9	43°2	Quelq. secousses
120	» 19'45"	4'14"	31.0	614	7.4	144	1.00	20.0	43°4	dans la nuque.
121	» 24'04"	4'19"	31.0	524	7.2	120	0.99	16.4	43°6	
122	» 28'18"	4'14"	23	600	5.3	141	0.73	20.0	43°8	R 40.
123	» 32'32"	4'14"	18	513	4.6	120	0.63	16.4	43°9	R 25.
124	» 36'47"	4'15"	13.4	569	3.0	135	0.40	18.0	44°	
125	» 41'00"	—	—	—	—	—	—	—	44°1	

Animal détaché : à 7 h. 50', 44°2 ; à 7 h. 55', 44°1. Lendemain, mort.

Cette très longue expérience, qui a duré plus de 9 h. (de 10 h. 16' du matin à 7 h. 55' du soir), comporte respectivement 125 annotations de temps, de VR, de T°, de dosages, etc., soit au total plus de mille données. Elle mériterait d'être examinée dans tous ses détails et à divers points de vue. Nous nous contentons de synthétiser et de commenter les principales données qui nous intéressent ici et qui sont reproduites par le fig. 10.

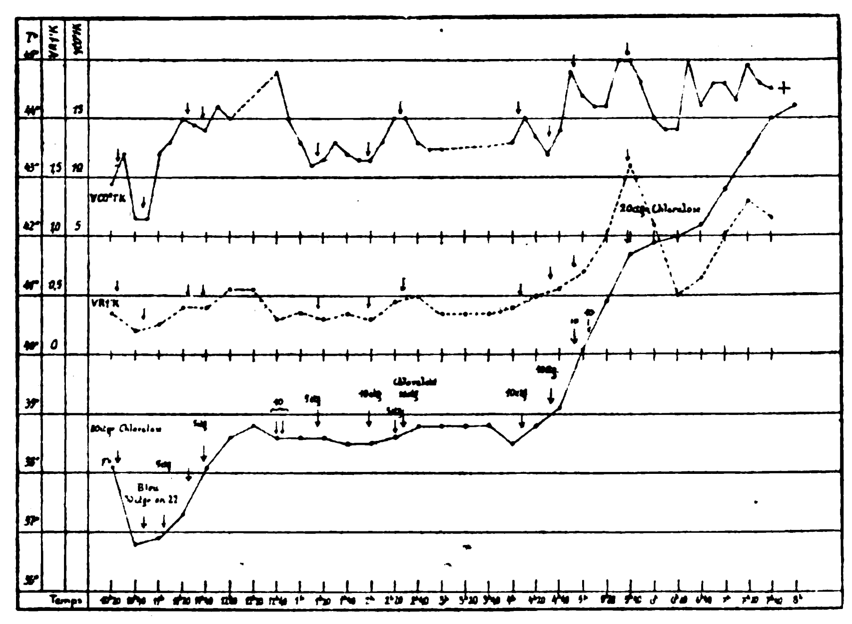


Fig. 10.

10 h. 18' à 20'	avant le sommeil par le chloralose $VCO^2l'K$ = 8.7 à 9.1 cc.
10 h. 22' à 29'	par excitation du chloralose $VCO^2l'K$ = 15—12 cc.
10 h. 42' à 46'	par la narcose $VCO^2l'K$=6.2 à 6.3 cc.
10 h. 47' à 56'	après trois injections de 5 ctgr. de bleu, $VCO^2l'K$ s'élève à 9—11 cc.; à noter que $VCO^2l'K$ augmente sensiblement avant que la température ne s'élève.
10 h. 56 à 11 h. 36'	à la suite de cinq nouvelles doses de 5 ctgr. de bleu, $VCO^2l'K$ s'élève à 14—16 cc. et la température monte à 37°8.
11 h. 36' à 12 h. 37'	le $VCO^2l'K$ s'élève jusqu'à 17 cc. et la température jusqu'à 38°7.
12 h. 39' et 43', 1 h. 20' et 2 h. 01'	quatre nouvelles doses de 5 ctgr. de bleu, $VCO^2l'K$ se maintient à 11—12 cc., la température s'abaisse à 38°5.
2 h. 20'	une nouvelle dose de 5 ctgr. de bleu fait monter sensiblement $VCO^2l'K$ à 16 cc. et T° à 38°8.
2 h. 32'	l'injection de 20 ctgr. de chloralose abaisse $VCO^2l'K$ jusqu'à 10—12 cc., la température reste stationnaire à 38°8.
3 h. à 4 h.	la température s'abaisse à 38°5; $VCO^2l'K$ pas dosé.
4 h. 09', 34', 52' et 5 h. 08'	quatre doses de 10 ctgr. de bleu: la température de 38°5 s'élève très rapidement à 41°8 et le $VCO^2l'K$ jusque 20 cc.; la polypnée s'établit.
à 5 h. 42'	l'injection de 20 ctgr. de chloralose fait disparaître la polypnée et abaisse $VCO^2l'K$ jusque 13—14 cc., mais la température, au lieu de s'abaisser, rebondit jusque 44°1 et $VCO^2l'K$ atteint de nouveau 16—20 cc. La polypnée, malgré nouvelle dose de bleu et hyperthermie considérable, n'a pas reparu.

En résumé cette expérience indique que la narcose chloralosique, même profonde, n'empêche pas l'augmentation carbonique par le bleu, d'où l'hyperthermie déjà signalée (C. Heymans et E. Maigre, loc. cit. p. 1) chez le chien anesthésié.

Expérience XIX.

CHIEN 50 : 7300 gr., ♂, adulte, bâtard.

3 h. 20' : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

N° D	T	T'	VR	VCO^2	VR1'	$VCO^2$1'	VR1'K	$VCO^2$1'K	T°	Remarques
	3 h. 36'55"									
1	» 41'26"	4'31"	20.2	284	4.4	64	0.6	8.6	37°8	
2	» 54'36"	—	—	—	—	—	—	—		
3	» 59'02"	4'26"	16.0	329	3.3	74	0.5	10.1	37°8	80 ctgr. chloralose
4	4 h. 03'22"	4'20"	25.0	329	6.0	76	0.8	10.4	37°6	en 5'.
5	» 07'40"	4'18"	34.0	519	8.4	12	1.1	16.4	37°3	R 10 par 1'.
6	» 11'58"	4'18"	7.6	194	1.8	45	0.23	6.1	37°1	Narcose totale.
7	» 16'16"	4'18"	7.8	239	1.8	54	0.23	7.3	37°	1° inj. 10 ctgr. bleu
8	» 20'36"	4'20"	5.6	239	1.3	53	0.17	7.2	36°9	en 4'. R 10-12.
9	» 24'53"	4'17"	6.4	239	1.4	54	0.18	7.3	36°9	Aucune secousse
10	» 29'14"	4'21"	8.2	283	1.8	65	0.24	9.0	»	2° inj. 5 ctgr
11	» 33'32"	4'18"	7.2	364	1.7	84	0.22	11.5	37°	bleu en 3'. = 15
12	» 37'50"	4'18"	8.4	362	2.0	84	0.27	11.5	37°1	ctgr.
13	» 42'08"	4'18"	9.0	373	2.1	86	0.30	11.8	37°2	3° inj. 5 ctgr. bleu
14	» 46'27"	4'19"	9.2	487	2.1	94	0.30	12.9	37°3	en 3' = 20 ctgr.
15	» 50'48"	4'21"	10.8	484	2.6	112	0.35	15.3	37°5	R 14-15. C = 150.
16	» 55'07"	4'19"	10.0	484	2.4	113	0.34	15.4	37°7	4° inj. 5 ctgr. bleu
17	» 59'23"	4'16"	10.0	508	2.4	120	0.34	16.4	37°9	en 3' = 25 ctgr.
18	5 h. 03'41"	4'18"	10.7	449	2.5	103	0.35	14.	38°	Hyperexcitabilité
19	» 08'00"	4'19"	11.7	541	2.7	124	0.37	17.0	38°2	réflexe; quelques
20	» 12'21"	4'21"	12.6	541	3.3	122	0.45	17.4	38°5	rares petites se-
21	» 16'39"	4'18"	12.0	564	3.0	131	0.40	18.0	38°7	cousses. C 150.
22	» 20'53"	4'14"	12.0	586	3.0	162	0.40	22.0	38°9	R 20.
23	» 25'12"	4'20"	13.0	508	3.0	118	0.40	16.2	39°	Quelques petites
24	» 29'32"	4'20"	12.2	508	3.0	118	0.40	16.3	39°2	secousses rares
25	» 33'51"	4'19"	12.1	530	3.0	123	0,40	17.2	39°4	et très limitées
26	» 38'10"	4'19"	13.3	496	3.0	114	0.40	15.5	39°6	R 16. C 160,
27	» 42'29"	4'19"	12.4	485	3.6	113	0.50	15.4	39°7	5° inj. 5 ctgr. bleu
28	» 46'45"	4'16"	15.4	508	3.2	120	0.44	16.4	39°8	en 3'. DT = 30
29	» 51'02"	4'17"	13.6	530	3.0	124	0.43	17.4	39°9	ctgr.
30	» 55'25"	4'23"	17.2	496	3.9	114	0.53	15.5	40°	R 24-25. C 160.
31	» 59'44"	4'19"	16.6	575	3.9	133	0.53	18.2	40°2	
32	6 h. 04'02"	4'18"	18.0	575	4.2	133	0.60	18.2	40°4	6° inj. 5 ctgr. bleu
33	» 08'21"	4'19"	18.8	530	4.2	123	0.60	17.2	40°5	en 3' = 35 ctg.
34	» 12'37"	4'16"	20.4	541	4.8	126	0.66	17.5	40°7	R 30. C 160.
35	» 17'00"	4'23"	18.5	575	4.2	126	0.60	17.5	40°8	Résolution musc.
36	» 21'17"	4'17"	19.3	529	4.5	123	0.61	17.2	40°9	touj. complète, à
37	» 25'34"	4'17"	18.1	495	4.2	115	0.60	15.6	41°	peine quelq. se-
38	» 29'54"	4'20"	24.9	687	5.7	158	0.78	21.7	41°1	cousses, R 44
39	» 34'11"	4'17"	29.0	608	6.8	144	0.93	20.0	41°3	R 76.

N° D	T	T'	VR	VCO^2	VRl'	VCO^2l	VRl'K	$VCO^2l'K$	T°	Remarques
40	6 h. 38'31"	4'20"	40.0	580	9.6	132	1.3	18.1	41°5	Plus de secousses.
41	» 42'49"	4'18"	53.4	564	12.4	131	1.7	18.0	41°6	R 150 ; quelques
42	» 47'09"	4'20"	60.2	541	13.8	123	1.9	17.2	41°8	mouvements de
43	» 51'31"	4'22"	64.2	619	14.7	142	2.0	20.2	42°	polypnée.
44	» 55'51"	4'20"	68.0	564	15.6	131	2.1	18.0	42°1	R 140 ; salivation
45	7 h. 02'16"	5'25"	77.1						42°2	débute seulem.;
46	» 06'33"	4'17"	73.0	553	16.8	129	2.3	17.8	42°3	résol. musc. touj.
47	» 10'52"	4'19"	77.0	664	18.0	156	2.5	21.5	42°4	complète. R 130.
48	» 15'19"	4'27"	82.0	709	18.4	168	2.5	23.0	42°6	Saliv. abondante.
49	» 19'48"	4'29"	86.0	709	19.2	166	2.6	22.8	42°7	R 125.
50	» 24'16"	4'28"	83.0	676	18.0	151	2.5	21.0	42°9	Aucune secousse;
51	» 28'48"	4'32"	83.0	709	18.0	156	2.5	21.5	43°	clignement pal-
52	» 33'15"	4'27"	81.0	653	18.0	147	2.5	20.3	43°1	pébral persiste.
53	» 37'43"	4'28"	80.0	731	18.3	164	2.5	22.4	43°2	R 100, plus prof.t
54	» 42'11"	4'28"	77.0	709	17.0	167	2.3	22.9	43°4	Saliv. abondante.
55	» 46'41"	4'30"	75.0	742	16.8	168	2.3	23.0	43°6	Sang suinte dans
56	51'08"	4'27"	70.0	709	15.8	168	2.2	23.0	43°8	plaie de la sa-
57	» 55'38"	4'30"	63.0	698	14.0	166	2.0	22.8	43°9	phène. R 100 ;
58	8 h. 00'08"	4'30"	52.0	620	11.4	138	1.6	18.7	44°	toujours aucune
59	» 04'36"	4'28"	40.5	575	9.6	128	1.3	17.7	44°1	secousse; flasque.
60	» 09'11"	4'35"	32.5	529	7.2	108	1.0	15.5	44°3	R 50 ; C 120.
61	» 13'44"	4'33"	27.3	575	6.0	146	0.8	20.6	44°5	R 40 ; C 140.
62	» 18'20"	4'36"	18.3	392	4.0	62	0.6	8.6	44°8	R 40 ; C 170.
63	» 22'56"	4'36"	10.6	339	2.3	53	0.3	7.3	45°	R 15-18 ; C 300.
64	» 27'32"	4'36"	0.2	148	—	32	—	4.4	45°	R arrêtée ; quelques secousses de la nuque ; cœur encore 120.

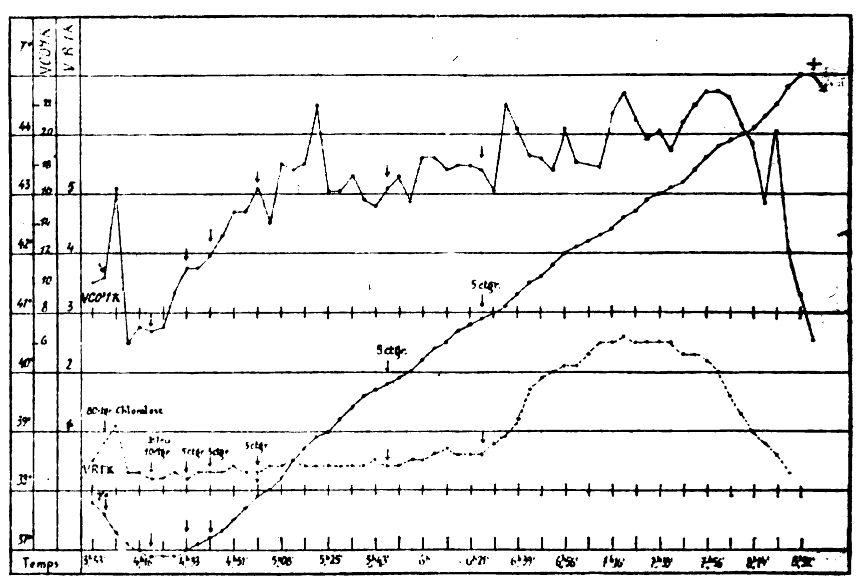


Fig. 11.

Cette expérience, résumée par les trois courbes ci-dessus, est des plus démonstratives.

Température : la température de 37°8 à 4 h. 00' tombe à 36°9(4 h. 21'), à la suite de l'injection de 80 ctgr. de chloralose. Après l'injection de la première dose de 10 ctgr. de bleu, la chute de température s'arrête et l'ascension commence après la 2e, pour s'accentuer aprés la 3e, 4e, 5e et 6e injection de 5 ctgr. de bleu (au total 35 ctgr. = 5 ctgr. au kilo). La température atteint finalement au moment de la mort le maximum tout à fait exceptionnelde 45° dument constaté, soit une hyperthermie de +8°1 en 3 h. 45'.

Volume respiratoire : Le VR1'K de 0.5 l. s'élève d'abord à 1,1 l. par l'injection de chloralose (excitation) ; puis, la narcose étant établie 4 h. 12', il tombe à 0.2-0.17 l.; il s'élève ensuite lentement à 0.4-0.5 l.; à 6 h. 04' à 26', n'atteint encore que 0.6 l., alors que la température a déjà atteint 41° La polypnée thermique d'origine périphérique a donc fait défaut; la fréquence respiratoire, tombée jusqu'à 10 par minute, s'accélère progressivement avec la température mais n'atteint encore que 30 par 1' à 40°-41°. A partir de 41° une tachypnée progressive s'installe, allant jusque 150 à la minute à 42°, et VR1'K dépasse 2.0 l.; à partir de 42°, la tachypnée diminue et bientôt aussi VR1'K (à partir de 43°9). Tandis que la température de 42° s'élève rapidement à 45°, la fréquence respiratoire diminue rapidement à 50, jusque 40 par 1" et VR1'K de 2.5 l. tombe parallèlement à 0.6 l. Pendant le dernier dosage complet qui précède la mort, la fréquence respiratoire est de 15-18 et VR1'K de 0.3 l., alors que la température saute de 44°8 à 45°.

Volume de CO^2 : Celui-ci est des plus suggestifs au point de vue du mode d'action du bleu. Au moment de l'injection du chloralose et pendant la très courte période d'excitation, $VCO^2$1'K, normal de 10.4 cc., s'élève jusqu'à 16.4 cc., puis tombe à 6.1. 7.3 et 7.2 cc.

Sans l'injection du bleu, l'hypothermie aurait été progressive (36°-34°-32°) ; le VR1'K, déjà à 0.17 l., serait tombé à 0.10 l. au moins et le $VCO^2$1'K à 6—5cc. Voilà que grâce à l'action stimulante du bleu, nous voyons que dès la première injection du bleu la chute de température s'arrête et le $VCO^2$1'K de 7.2 s'élève à 9.0 cc., à 12 cc., jusqu'au de là de 16 cc. Notons que, pendant ce même temps, la température ne s'élève que peu et le VR1'K de même ; l'augmentation de CO^2 précède l'élévation de température.

De 5 h. 04' à 6 h. 25, la température s'élève de 38° à 41°, le VCO²l'K oscille entre 16 et 18 cc. avec un VRl'K de 0.5—0.6 l.

Comme dit plus haut, la respiration s'accélère notablement à partir de 41°, le VR est quadruplé; pendant cette période de tachypnée, et non de polypnée, le VCO²l'K oscille entre 20 et 22 cc. ; lorsque VR et la fréquence respiratoire ont déjà notablement diminué, le VCO²l'K se maintient encore au-delà de 20 cc. : de 44° à 44°5, il est encore de 18-20 cc.; de 44°5 à 45°, l'élimination de CO² diminue brusquement parce que le VR présente une chute brusque; l'animal meurt à 45° en état asphyxique, parce que le centre respiratoire cesse de fonctionner, et cet arrêt respiratoire entraîne l'arrêt cardiaque. La température ne s'élève plus après la mort.

Evidemment la teneur en % de CO² dans l'air expiré et dans le sang varie en raison inverse de VRl'K et de VCO²l'K ; nous n'insistons pas sur ce point dans le présent mémoire.

Ces deux expériences XVIII et XIX nous permettent de donner une réponse à la question : le bleu produit-il une augmentation carbonique et une élévation de température chez l'animal chloralosé ? La réponse est nettement affirmative ; les combustions augmentent chez le chien narcotisé, immobile, en résolution musculaire, donc sans tonus (dans le sens physiologique du mot) ; l'hypermétabolisme carbonique n'est donc point lié à une hyperfonction de la contractilité musculaire, puisqu'il se produit encore alors que toute contraction musculaire est supprimée (1).

Ce fait mérite de fixer l'attention à un autre point de vue, car il nous permet de faire un rapprochement que nous considérons du plus haut intérêt: le chien chloralosé et hyperthermisé n'est-il point comparable à un chien en état fébrile? Commedans la fièvre, l'hyperthermie du chien chloralosé n'est point accompagnée d'une exagération du tonus musculaire; l'animal est immobile, affalé, tout en présentant une température de 41°-43°-45°. Toute substance «pyrétogène» hyper thermise et en même temps dérègle le centre thermorégulateur dans sa lutte antihyperthermique, c'est la fièvre. Le bleu d'une part hyperthermise ; le chloralose d'autre part diminue, voire supprime, la lutte du centre thermorégulateur contre l'hyperthermie ; de là comme chez le fébricitant, la respiration est relativement lente, peu rapide aux températures de 39°, 40°, 41° ; elle s'accélère à partir de 41° à 43°.

La vraie fièvre du chien et l'hyperthermie du chien chloralosé par le bleu présentent tant d'analogies symptomatiques qu'elles méritent certes une étude approfondie comparée. Cette hyperthermie est, en effet, la reproduction expérimentale du syndrome fébrile, non par un agent pyrétique à composition indéterminée, mais à l'aide de deux substances, bleu de méthylène et chloralose, à formules chimiques définies.

---

(1) A ce sujet comparer : W. Koskowski et E. Maigre : *Action paralysante du bleu de méthylène sur les terminaisons nerveuses parasympathiques*. Comptes rendus Ac. Sciences, Paris, 29-8-21 p. 397. — Id., *Origine périphérique de l'hyperthermie provoquée par le bleu de méthylène*. Ibid. p. 447.

2° CHLORAL.

Le chloralose narcotise le cerveau, mais augmente l'excitabilité réflexe; le chloral, par contre, peut paralyser cerveau et moëlle; les réflexes diminuent et disparaissent; la résolution musculaire devient profonde comme dans la narcose chloroformique.

Il s'agit de déterminer si le bleu de méthylène arrête la chute de température et de l'élimination carbonique chez le chien chloralisé et la remplace par une augmentation carbonique et calorique. La réponse expérimentale à cette question est encore incomplète : le chloral et le bleu sont en effet deux paralysants cardiaques ; les chiens auxquels on administre simultanément ces deux substances succombent rapidement.

Voici le résumé d'une des expériences.

Expérience XX.

CHIEN 51 : 6900 gr., ♂, adulte, bâtard.

9 h. 40′ : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

10 h. 18′	75 ctgr. chloral intrav.	39°	
» 25′	25 » » »	38°8	
» 36′	25 » » »	38°6	
» 39′	25 » » »	38°5	Narcose profonde.
» 47′	10 » bleu en 5′	38°1	Réflexe oculaire = o.
» 58′	5 » bleu en 3′	38°2	
11 h. 01′		38°3	
» 05′		38°4	R 28-30, quelques mouvements
» 09′	25 » chloral intrav.	38°6	
» 12′	5 » bleu en 4′	38°8	Réflexe oculaire = o.
» 16′		39°	
» 23′		39°3	Mort, probablement par syncope cardiaque.

Dose totale de chloral : 1.75 gr., soit 0.25 gr. au kilo.

Malgré la narcose complète, jusqu'à disparition du réflexe palpébral, la température de 39° qui s'est abaissée à 38°1 par la narcose, au lieu de continuer sa chute, se relève à 38°3 (14′ après la 1re injection de bleu et 3′ après la 2me injection), puis à 38°6 (11 h. 09′); une nouvelle injection de chloral n'arrête pas cette ascension thermique; à la suite d'une 3me injection de bleu, elle atteint 39°3 (11 h. 23′).

Cette expérience, quoique courte, est néamoins significative: l'hyperthermie se manifeste malgré la chloralisation jusqu'à disparition complète du réflexe oculaire.

3° CURARE.

Nous avons expérimenté jusqu'ici sur trois chiens curarisés. Les résultats, tout incomplets qu'ils soient, démontrent cependant déjà dans quel sens le bleu agit après curarisation.

Voici le résumé d'une expérience.

Expérience XXI.

CHIEN 53 : 7200 gr. ♂, adulte.

9 h. 10' : fixé, trachéotomie, canule dans veine saphène.

9 h. 53'	15 mg. curare intrav.	38°3	
» 59'		38°	
10 h. 03'	5 mg. curare intrav.	37°9	
» 07'	5 mg. curare intrav.	37°7	Respiration artificielle.
» 15'	10 ctgr. bleu	37°4	
» 30'	5 ctgr. bleu	37°3	
» 34'		37°5	
» 37'		37°7	
» 40'		38°	
» 43'		38°1	
» 45'	5 ctgr. bleu	38°1	
» 49'		38°3	
» 52'		38°4	
» 55'		38°5	

Ce chien a été paralysé profondément par les 25 mg. de curare: il a fallu instituer la respiration artificielle. La température présente une chute rapide jusque 37°3; mais, après deux injections de bleu, elle se relève jusqu'à 38°1 ; 10 minutes après la 3e injection, elle atteint 38°5.

Chez le chien curarisé le bleu de méthylène arrête donc l'hypothermie et relève lentement la température.

Les expériences XX et XXI font présumer une augmentation carbonique parallèle. Nous comptons les compléter et exposer leurs résultats dans un mémoire ultérieur.

CONCLUSIONS ET RÉSUMÉ.

Nous nous abstenons provisoirement de toute discussion d'ordre général ou spécial; nous nous contentons de tirer les conclusions qui résument brièvement les résultats essentiels de nos expériences et leur signification :

1°) Le bleu de méthylène est un hyperthermisant des plus énergiques ; administré à la dose unique de 4-6 ctg. au kilo, ou a doses fractionnées appropriées, il peut élever la température rectale, en moins d'une heure, jusqu'à 44°-45°.

L'hyperthermie, à elle seule, n'est mortelle pour le chien qu'à partir de 44°-45° ; toute mort à une température inférieure est due à une autre cause adjuvante.

2°) Le volume respiratoire normal de 0.3-0.4 l. par minute et par kilo augmente progressivement avec la température ; l'hyperthermie déclanche d'abord la polypnée réflexe, puis la polypnée centrale: le volume respiratoire atteint alors un maximum de 1.5-2.0 l. par minute et par kilo aux températures de 42°5-43°; ensuite il diminue progressivement au-dessus de 43° jusqu'au moment de la mort à 44°-45°.

3° L'hyperthermie est accompagnée d'une élimination plus considérable de CO^2. Le volume d'anhydride carbonique, dégagé par un chien normal (38°-39°) par minute et par kilo est de 10-11 cc.; ce volume peut atteindre 35-40 cc. par minute et par kilo aux températures de 43°-44°. L'augmentation carbonique est d'autant plus grande que l'hyperthermie est plus rapide; elle persiste jusque peu de minutes avant la mort. Le volume total de CO^2 éliminé pendant l'hyperthermie correspond à une somme de calories suffisantes pour chauffer le corps de l'animal et pourvoir à une déperdition calorique plus grande. L'augmentation carbonique ou de combustion précède l'ascension thermique, et l'hypermétabolisme carbonique provoque l'hyperthermie.

4°) Pendant l'hyperthermisation par le bleu, le chien est calme, légèrement assoupi; point de convulsions ni hypertonicité musculaire. Le bleu de méthylène n'est donc pas un hyperthermique convulsivant.

5°) Chez le chien, mis en état de résolution musculaire par le chloral ou par le curare, le bleu de méthylène arrête la chute de température, puis la ramène tout au moins au niveau normal; chez le chien chloralosé, le bleu provoque une hyperthermie maxima jusqu'à 45°, avec une augmentation parallèle de CO^2.

Donc, le bleu de méthylène n'hyperthermise pas par une augmentation du tonus ou de la contraction musculaire. Dès lors, par exclusion, nous sommes amenés à supposer qu'il exerce une action

stimulante, directe ou indirecte, sur le métabolisme nutritif cellulaire. En d'autres mots, le bleu de méthylène serait hyperthermisant parce qu'il est hypermétabolisant, direct s'il active immédiatement les oxydations intracellulaires, comme catalyseur ou autrement, ou bien indirect s'il augmente médiatement ces oxydations par action sur l'innervation trophique, sympathique, parasympathique, ou autre (1).

6) Le chien, dont la sensibilité du centre thermorégulateur antihyperthermique est diminuée par le chloralose, présente, pendant son hyperthermisation par le bleu de méthylène, un état respiratoire et circulatoire analogue à celui du chien fébricitant. Le bleu de méthylène associé au chloralose permet ainsi de reproduire expérimentalement un état fébrile, ce tout au moins en ce qui concerne le triple symptome : température, respiration et circulation (2).

---

(1) La thionine et le bleu d'azur sont probablement des stimulants métaboliques au même titre que le bleu de méthylène, car, comme ce dernier, ils hyperthermisent le chien.

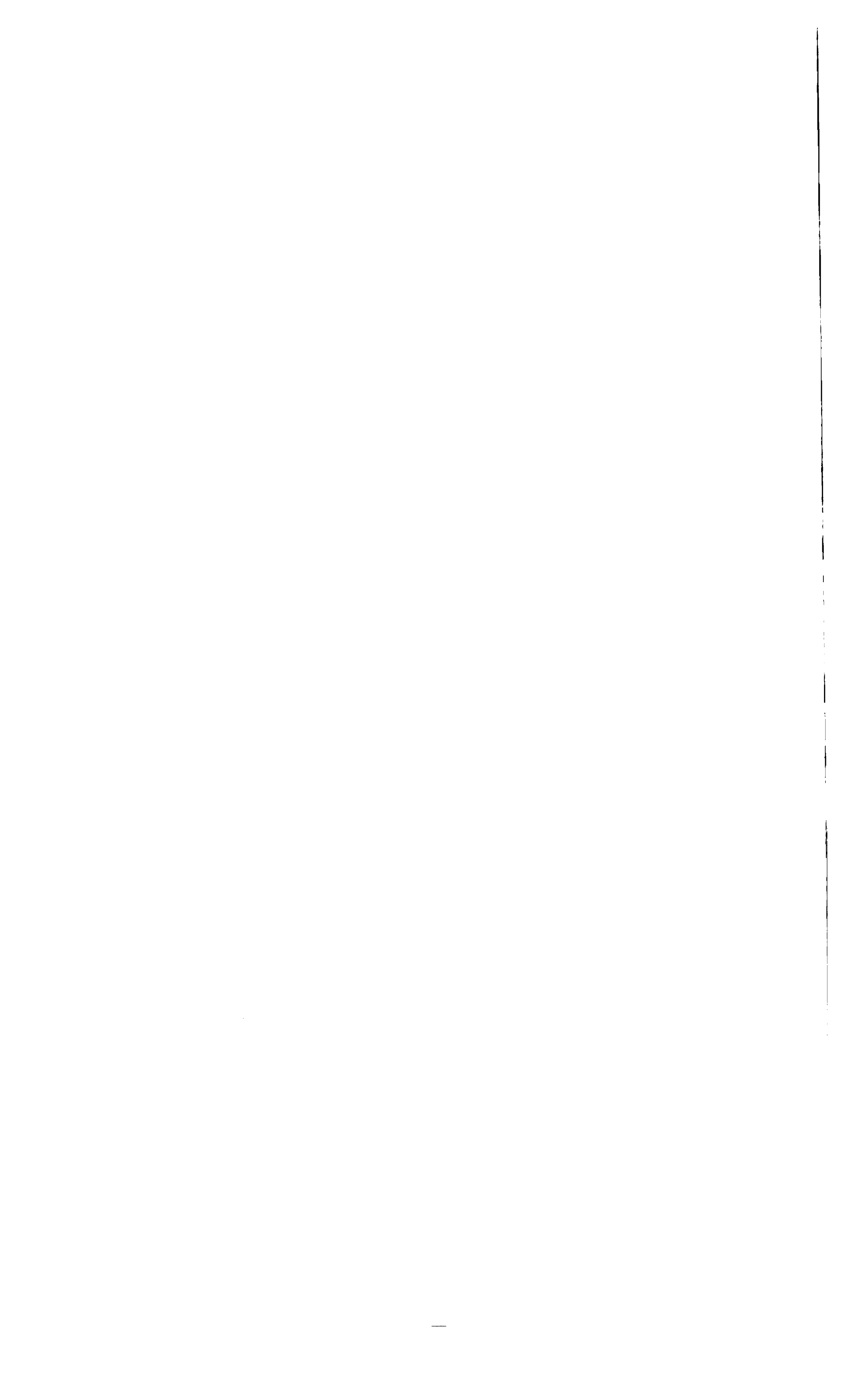
(2) A l'occasion de ce mémoire et de ces conclusions, rappelons les paroles suivantes de CLAUDE BERNARD :

« La prétention d'être complet, dont on abuse si souvent, n'est qu'une pure illusion en physiologie et en médecine ; je dirai même que l'essai d'une semblable réalisation peut offrir un véritable danger.

» Il faut bien être convaincu que dans des sciences encore aussi peu avancées que le sont la physiologie et la médecine, le point principal est d'indiquer ou d'éboucher une question nouvelle. Celle-ci, pour se développer, suivra ensuite une évolution successive plus ou moins lente, pendant laquelle l'idée première ou le point de vue général devront souvent changer.

» Dans le moment actuel, un auteur qui voudrait rechercher la perfection et qui attendrait pour écrire la solution complète de tous les problèmes posés se réduirait à une stérilité absolue. » (*Leçons sur les effets des substances toxiques et médicamenteuses* 1857, p. VI et VII).

TABLE DES MATIÈRES.





Sr.

